



*Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του
εκχυλίσματος του φυτού *Conium divaricatum*
σε ενδοθηλιακά κύτταρα*

*Study of antioxidant activity of *Conium divaricatum* extract on
endothelial cells*

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Ευτυχία Κοντοζήση

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σέρκος Χαρουτουνιάν: Καθηγητής Χημείας του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του κ. Στάγκου Δημήτριου, Επίκουρου Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Στάγκο Δημήτριο για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις και για την αμέριστη βοήθεια και το ενδιαφέρον του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, Καθηγητή Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις πολύτιμες συμβουλές και τις γνώσεις που μου μετέδωσε σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος σπουδών μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην κ. Θάλεια Κερασιώτη για την καθοριστική βοήθειά της και την στήριξη καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Αλέξανδρο Πρίφτη, Παρασκευή Κουκά και Σωτηρίνα Μακρή για τις συμβουλές και την στήριξή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνών δείχνει την αλληλοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ των ελευθέρων ριζών και διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές νόσοι. Μελέτες δείχνουν ότι αρκετά φυτικά εκχυλίσματα τα οποία είναι πλούσια σε πολυφαινόλες έχουν αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση. Για το λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση του υδατικού εκχυλίσματος *Conium divaricatum* στην κυτταρική σειρά EA.hy926.

Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος στα ενδοθηλιακά κύτταρα (σειρά EA.hy926) εξετάστηκε με πέντε μεθόδους-δείκτες. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρομετρία ροής για την εύρεση των επιπέδων της ενδογενούς γλουταθειόνης (GSH) και των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS). Τα αποτελέσματα δείχνουν την προστατευτική δράση του εκχυλίσματος με την αύξηση των επιπέδων της γλουταθειόνης. Στην συνέχεια μελετήθηκε η λιπιδική υπεροξείδωση (TBARS), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) και η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARBs). Τα αποτελέσματα των φασματοφωτομετρικών μεθόδων έδειξαν μείωση της λιπιδικής υπεροξείδωσης και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων που φτάνει στο 61%. Η αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας φτάνει στο 174%. Έτσι, το εκχύλισμα παρουσίασε σημαντική αντιοξειδωτική δράση και προστασία στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Τέλος, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης το εκχύλισμα παρουσιάζει σημαντική αντιοξειδωτική δράση όμως απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να διευκρινιστεί ο μηχανισμός στον οποίο οφείλεται η δράση του. Κατά συνέπεια προτείνεται η ανάκτηση, με χρήση σύγχρονων και ασφαλών για την ανθρώπινη υγεία μεθόδων, των φυτικών πολυφαινολών που περιέχονται στο εκχύλισμα για την χρήση του ως συμπλήρωμα άλλων τροφών ή για την δημιουργία νέων προϊόντων.

ABSTRACT

In recent years, a large number of studies have shown the important causative role of free radicals in various diseases such as cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases. Studies have shown that many plant extracts that are rich in polyphenols have antioxidant and chemoprotective activity. For this reason, the present study examined the antioxidant activity of an aqueous extract from *Conium divaricatum* in the endothelial EA.hy926 cell line.

The antioxidant effect of the extract on endothelial cells (EA.hy926) was examined by assessing five oxidative stress factors. Initially, flow cytometry was used to determine the levels of endogenous glutathione (GSH) and free radicals levels (ROS). The results showed the antioxidant effect of the extract by increasing the levels of glutathione. Subsequently, lipid peroxidation (TBARS), total antioxidant capacity (TAC) and concentration of protein carbonyl (CARBs) were assessed. The results of the spectrophotometric methods showed a reduction in lipid peroxidation and protein carbonyl levels up to 61%. The increase in total antioxidant capacity was up to 174%. Thus, the extract exhibited significant antioxidant activity and protection in endothelial cells.

Finally, based on the results of the present study, the extract was shown to possess significant antioxidant activity, but further studies are needed in order to clarify the mechanisms through which its effects are exerted. It is therefore proposed to recover, using modern and safe methods for human health, the plant polyphenols contained in the extract for use as food supplement or for the creation of biofunctional foods.

Περιεχόμενα

Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος του φυτού <i>Conium divaricatum</i> σε ενδοθηλιακά κύτταρα	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Ελεύθερες ρίζες	9
1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).....	10
1.2.1 Ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$)	10
1.2.2 Ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot})	10
1.2.3 Μονήρες οξυγόνο (1O_2).....	11
1.2.4 Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)	11
1.3 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	11
1.3.1 Ενδογενείς πηγές	11
1.3.1.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση	12
1.3.1.2 Ουδετερόφιλα και αναπνευστική “έκρηξη”	12
1.3.1.3 Μετατροπή της ζανθίνης σε ουρικό οξύ	13
1.3.1.4 Κυτόχρωμα P_{450}	14
1.3.1.5 Αυτοοξείδωση μορίων.....	14
1.3.2 Εξωγενείς πηγές	14
1.4 Βιολογική δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου.....	15
1.4.1 Θετικές επιδράσεις	15
1.4.2 Επιβλαβείς επιδράσεις.....	15
1.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	18
1.5.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	18
1.5.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	20
1.6 Οξειδωτικό στρες	22
1.7 Πολυφαινόλες.....	22
1.7.1 Φλαβονοειδή	22
1.7.2 Μη φλαβονοειδή	23
1.7.3 Οι επιδράσεις των πολυφαινολών στην υγεία	23
1.8 <i>Conium divaricatum</i>	25
1.9 Ενδοθηλιακά κύτταρα	26
2. ΣΚΟΠΟΣ	27
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
3.1. Υλικά.....	28

3.1.1 Χημικά αντιδραστήρια	28
3.1.2 Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος	28
3.1.3 Καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy 926	28
3.1.4 Πειραματικός σχεδιασμός	29
3.2 Μέθοδοι.....	30
3.2.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράση του εκχυλίσματος <i>Conium divaricatum</i> με τη μέθοδο ΧΤΤ.....	30
3.2.1.1 Αρχή μεθόδου ΧΤΤ.....	30
3.2.1.2 Πειραματική διαδικασία μεθόδου ΧΤΤ.....	31
3.2.2 Προσδιορισμός της ενδογενούς γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής	32
3.2.2.1 Πειραματική διαδικασία.....	34
3.2.3 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης.....	35
3.2.3.1 Αρχή μεθόδου.....	35
3.2.3.2 Πειραματική διαδικασία.....	35
3.2.3.3 Υπολογισμοί.....	36
3.2.4 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας	36
3.2.4.1 Αρχή μεθόδου.....	36
3.2.4.2 Πειραματική διαδικασία.....	36
3.2.4.3 Υπολογισμοί.....	37
3.2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	38
3.2.5.1 Αρχή μεθόδου.....	38
3.2.5.2 Πειραματική διαδικασία.....	38
3.2.5.3 Υπολογισμοί.....	39
3.2.6 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford	39
3.2.7 Στατιστική ανάλυση	40
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	41
4.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράση του εκχυλίσματος <i>Conium divaricatum</i> με τη μέθοδο ΧΤΤ.....	41
4.2 Προσδιορισμός της ενδογενούς γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής	42
4.2.1 Προσδιορισμός γλουταθειόνης.....	42
4.2.2 Προσδιορισμός ROS	44
4.3 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης	46

4.4 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας	46
4.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων	47
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Εξουδετέρωση ελεύθερης ρίζας.....	9
Εικόνα 2: Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών.....	14
Εικόνα 3: Επιβλαβείς επιδράσεις ελευθέρων ριζών.....	17
Εικόνα 4: A. Conium divaricatum.....	26
Εικόνα 5: Ενδοθηλιακά κύτταρα.....	27
Εικόνα 6: Πειραματικός σχεδιασμός.....	30
Εικόνα 7: Μετατροπή ΧΤΤ σε φορμαζάνη.....	30
Εικόνα 8 : Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.....	32
Εικόνα 9: Κυτταρόμετρο ροής.....	34
Εικόνα 10: Αρχή μεθόδου TBARS.....	35
Εικόνα 11: Αρχή μεθόδου TAC.....	36
Εικόνα 12 : Αρχή μεθόδου CARBs.....	38

Περιεχόμενα Γραφημάτων

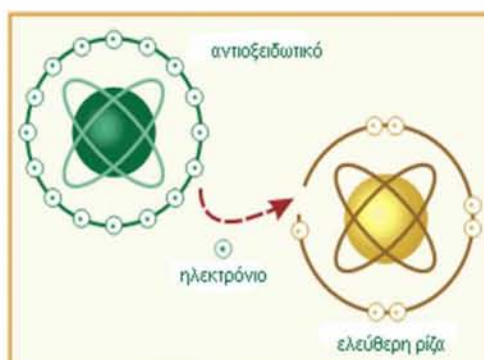
Γράφημα 1 : Αποτελέσματα ΧΤΤ.....	41
Γράφημα 2: Αποτελέσματα της μεθόδου κυτταρομετρία ροής για τα επίπεδα της GSH.....	42
Γράφημα 3: Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy 926 για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης (GSH).....	43
Γράφημα 4: Αποτελέσματα της μεθόδου κυτταρομετρία ροής για τα επίπεδα των ROS.....	44
Γράφημα 5: Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy 926 για τον προσδιορισμό των ελευθέρων ριζών (ROS).....	45
Γράφημα 6: Αποτελέσματα της λιπιδικής υπεροξειδωσης.....	46
Γράφημα 7: Αποτελέσματα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.....	47
Γράφημα 8: Αποτελέσματα της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	47

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται μόρια ή και άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα τους (Halliwell & Gutteridge 1998). Το άτομο του υδρογόνου, το οποίο αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο, είναι η πιο απλή ελεύθερη ρίζα. Η αστάθεια και η δραστικότητα των ελεύθερων ριζών είναι χαρακτηριστική καθώς προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια, οξειδώνοντάς τα (Sen, 2001; Prior & Cao, 1999).

Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους σχηματίζουν μια μη ρίζα, η οποία είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Στην περίπτωση που οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, παραδείγματος χάριν



τα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), δημιουργούνται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά και να έχει δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell, 2001; Halliwell & Gutteridge 1998).

Στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), του αζώτου (RNS), του θείου (RSS) και του χλωρίου (RCIS). Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$), του υδροξυλίου (OH^{\cdot}), του αλκοξυλίου (RO^{\cdot}) και του υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}). Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ρίζες παράγωγα του οξυγόνου, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), οι ρίζες τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^{\cdot}), οι θειούχες ρίζες (RS^{\cdot}) και το υποχλωριώδες οξύ ($COCl$).

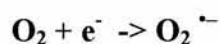
Στις δραστικές μορφές του αζώτου εντάσσονται ρίζες όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO^{\cdot}) και το διοξείδιο του αζώτου (NO_2^{\cdot}) καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες όπως το νιτρώδες οξύ (HNO_2) και το ανιόν του νιτρικού

υπεροξειδίου (ONOO⁻) (Halliwell & Gutteridge, 1998; Halliwell, 2001; Fang et al., 2002).

1.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

1.2.1 Ανιόν του σουπεροξειδίου (O₂^{•-})

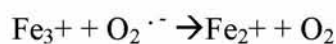
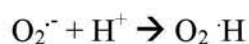
Το σουπεροξειδίο αρχικά σχηματίζεται σαν ένα ενδιάμεσο προϊόν βιοχημικών αντιδράσεων. Αυτό το ανιόν είναι αρνητικά φορτισμένο και είναι σχετικά αδιαπέραστο στη μεμβράνη. Το ανιόν του σουπεροξειδίου σχηματίζεται από την οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ του μοριακού οξυγόνου και ενός ηλεκτρονίου,



Η ρίζα του σουπεροξειδίου μπορεί να σχηματιστεί από την απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων στο O₂ από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου. Η ρίζα του σουπεροξειδίου μπορεί επίσης να σχηματιστεί από φαγοκύτταρα κατά τη διάρκεια της δράσης τους. Μικρότερες ποσότητες O₂^{•-} παράγονται σαν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια από πολλούς τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των ινοβλαστών. Η ρίζα του σουπεροξειδίου παράγεται επίσης από τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης κατά τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ.

1.2.2 Ρίζα υδροξυλίου (OH[•])

Η ρίζα υδροξυλίου είναι εξαιρετικά δραστική και προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου (O₂^{•-}) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas and Kouretas, 1999).



Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες,

λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις της ρίζας υδροξυλίου είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου (Halliwell and Gutteridge, 1999).

1.2.3 Μονήρες οξυγόνο ($^1\text{O}_2$)

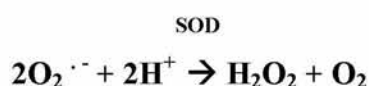
Το μονήρες οξυγόνο ($^1\text{O}_2$) σχηματίζεται μέσω μιας αλλαγής στην κατάσταση του spin, από παράλληλη σε αντιπαράλληλη. Αυτό αυξάνει πάρα πολύ τη δραστηριότητά του επειδή αναιρείται ο περιορισμός του spin. Μπορεί να αντιδράσει εύκολα με αμινοξέα (όπως η κυστεΐνη, η μεθειονίνη, η τρυπτοφάνη και η ιστιδίνη) και αποτελεί το μεγαλύτερο καταλύτη για την έναρξη της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, η οποία οδηγεί σε καταστροφή των μεμβρανών. Το $^1\text{O}_2$ σχηματίζεται κατά την άμεση μεταφορά ενέργειας από φωτοευαίσθητα μόρια.

1.2.4 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι ένα δραστικό μόριο, που μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως η ρίζα του υδροξυλίου. Είναι σταθερό, διαπερατό στις μεμβράνες και έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής μέσα στο κύτταρο. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι κυτταροτοξικό αλλά θεωρείται ένας σχετικά ασθενής οξειδωτικός παράγοντας. Η κυτταροτοξικότητά του εμφανίζεται μέσω της ικανότητάς του να παράγει ελεύθερες ρίζες μέσω μεταλλο-καταλυόμενων αντιδράσεων όπως η αντίδραση Fenton:



Το υπεροξειδίο του υδρογόνου σχηματίζεται από οξειδάσες, οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο, όπως οι οξειδάσες των αμινοξέων, η οξειδάση της γλυκόζης και η οξειδάση του γλυκολικού. Σχηματίζεται επίσης με αυτο-οξειδοαναγωγή της ρίζας υπεροξειδίου:



1.3 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.3.1 Ενδογενείς πηγές

Ως ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών χαρακτηρίζονται οι διαδικασίες κατά τις οποίες παράγονται ελεύθερες ρίζες στο εσωτερικό του κυττάρου ενεργώντας μέσα σε αυτό. Επίσης περιλαμβάνονται και οι διαδικασίες κατά τις

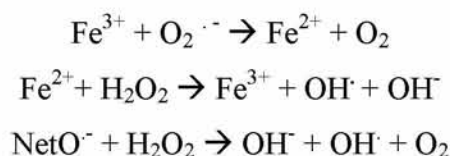
οποίες σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες στο εσωτερικό του κυττάρου, αλλά απελευθερώνονται στη γύρω περιοχή.

1.3.1.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδοκυτταρική πηγή ROS. Η πλειοψηφία των ROS παράγεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια αφού το 0,1-1% του οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζα.

Η αφυδρογονάση του NADH (σύμπλεγμα 1) και το σύμπλεγμα κυτοχρώματος bc1 (σύμπλεγμα 3), είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $O_2^{\cdot -}$ και H_2O_2 (Chance, Sies, & Boveris, 1979). Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και FADH₂ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2^{\cdot -}$ (Chance et al., 1979). Το $O_2^{\cdot -}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Ακόμα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $O_2^{\cdot -}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται OH^{\cdot} .

Αντίδραση Haber-Weiss:



Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξείδιο του αζώτου (NO) από την συνθάση του NO. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ($ONOO^-$), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ($ONOOH$). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες $O_2^{\cdot -}$ και NO_2^{\cdot} .

Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη (UQH_2) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$).

1.3.1.2 Ουδετερόφιλα και αναπνευστική “έκρηξη”

Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMN) είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την

προσβολή τους από ιούς και βακτήρια. Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς.

Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το $O_2^{\cdot -}$ κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης.

Τα λυτικά ένζυμα διευκολύνουν την καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες ενώ το $O_2^{\cdot -}$ παράγεται από τη μυελοϋπεροξειδάση και την NADPH οξειδάση. Η κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου μετατρέπει το $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε OH^{\cdot} από ιόντα μετάλλων ή σε $HOCl$.



Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση θεωρείται σημαντική για την απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση βακτηριακής και ιϊκής μόλυνσης. Ωστόσο, ROS και άλλα οξειδωτικά μόρια που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων. Η φαγοκυττάρωση βακτηρίων ή ιών, προκαλεί το φαινόμενο που είναι γνωστό και ως αναπνευστική «έκρηξη». Χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης από τα κύτταρα και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή σουπεροξειδίου και εν τέλει $HOCl$.

1.3.1.3 Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (Downey, 1990; Kuppusamy & Zweier, 1989). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ATP αποφωσφορυλιώνεται σε ADP και AMP εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύεται από σχηματισμό του $O_2^{\cdot -}$.

Η οξειδάση της ξανθίνης πρέπει να μετατραπεί από την ανηγμένη στην οξειδωμένη της μορφή από μία ενδοκυτταρική πρωτεάση που ενεργοποιείται από το Ca^{2+} ενώ το μοριακό οξυγόνο είναι δέκτης ηλεκτρονίων.

1.3.1.4 Κυτόχρωμα P₄₅₀

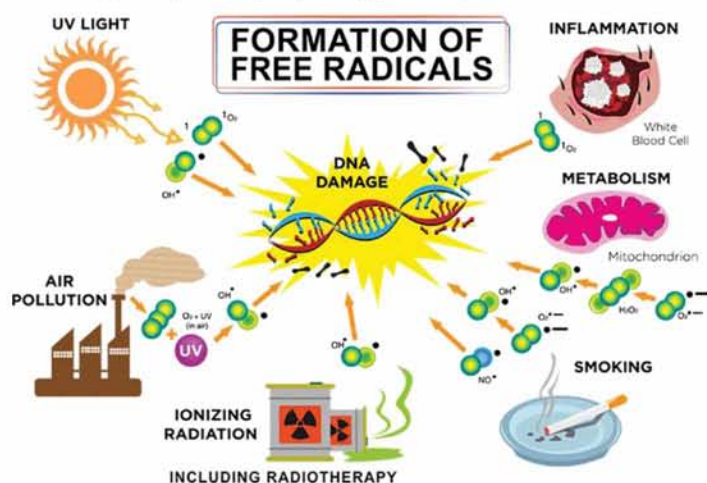
Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P₄₅₀ (Yu, 1994). Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας $O_2^{\bullet -}$ το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε H₂O₂ (Chance et al., 1979). Ο ρυθμός παραγωγής του H₂O₂ είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα. Παρουσία ADP και Fe³⁺ η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O₂ παράγοντας $O_2^{\bullet -}$.

1.3.1.5 Αυτοοξείδωση μορίων

Ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν (ουσιαστικά πρόκειται για ανάφλεξη χωρίς φλόγα έπειτα από αντίδραση με οξυγόνο) σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$).

1.3.2 Εξωγενείς πηγές

Ως εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών χαρακτηρίζονται ετερογενείς παράγοντες όπως η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα. Ακόμη, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από τη δράση ορισμένων φαρμάκων (Naito, Yoshikawa, Yoshida, & Kondo, 1998; Ray et al., 2001) και άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς και από το αλκοόλ (Elsaye, Omaye, Klain, & Korte, 1992; Jones et al., 2000; Obata, Yamanaka, Kinemuchi, & Orelund, 2001). Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή (Ames, 1986; Kanner & Lapidot, 2001; Lijinsky, 1999).



Εικόνα 2: Εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών.

1.4 Βιολογική δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου

1.4.1 Θετικές επιδράσεις

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου έχουν και ευεργετικές δράσεις όταν αυτές εμφανίζονται στον οργανισμό σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι ROS συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια ενδοκυτταρικά αλλά και διακυτταρικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η δυνατότητα της τροποποίησης της δραστικότητας πρωτεϊνών προκαλώντας το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Μερικοί από τους πρωτεϊνικούς στόχους των ROS είναι οι φωσφατάσες, MAP κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες και απακετυλάσες ή μεθυλάσες ιστονών. Ακόμα, οι ROS έχουν σημαντικό ρόλο σε ορισμένους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης.

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου ρυθμίζουν μηχανισμούς σχετικούς με την ανοσία, τον μεταβολισμό του κυττάρου, τον πολλαπλασιασμό του, την μυϊκή συστολή και την απόπτωση. Η αναστολή της παραγωγής των ROS έχει δυσμενείς συνέπειες όπως απώλεια της μυϊκής συστολής αντίθετα η έντονη παραγωγή των ROS έχει ως αποτέλεσμα την μυϊκή κόπωση.

1.4.2 Επιβλαβείς επιδράσεις

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου εκτός από τις θετικές επιδράσεις τους, έχουν συνδεθεί και με τις επιβλαβείς τους δράσεις, καθώς αλλάζουν το μέγεθος και το σχήμα των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρούν (Cooper et al., 2002). Ακόμη, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα) προκαλώντας την καταστροφή ή αλλοίωσή τους. Ως αποτέλεσμα αυτών των αρνητικών ενεργειών, οι ROS έχουν συνδεθεί με νευροεκφυλιστικές νόσους (Parkinson's, Alzheimer's, κατάθλιψη), φλεγμονές, λοιμώδεις νόσους, νόσους των νεφρών, ηπατικές νόσους, πνευμονικές νόσους, με τη γήρανση καθώς και με διάφορους τύπους καρκίνου (Golden et al., 2002).

Οξείδωση Λιπιδίων

Η οξείδωση των λιπιδίων είναι μια από τις δυσμενείς επιπτώσεις των ελεύθερων ριζών. Τα λιπίδια όταν αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες, μπορεί να υποβληθούν σε μια εξαιρετικά επιζήμια αλυσιδωτή αντίδραση λιπιδικής

υπεροξειδωσης, οδηγώντας τόσο σε άμεσες όσο και σε έμμεσες επιπτώσεις. Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ευάλωτες στην οξειδωση λόγω των υψηλών επιπέδων των ακόρεστων λιπαρών οξέων.

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια την έναρξη, την διάδοση και τον τερματισμό (Girotti, 1985). Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την δράση της ελεύθερης ρίζας, η οποία αποσπά ένα άτομο υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει ROO[•] κατά τη διάρκεια της φάσης πολλαπλασιασμού. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες- επαναδιευθέτηση και αλληλεπίδραση με οξυγόνο (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Η οξειδωση των λιπιδίων έχει συσχετισθεί με διάφορες ασθένειες όπως την αθηροσκλήρωση (Guo et al., 2001, Witztum & Steinberg, 2001), την καρδιακή ανεπάρκεια (Mozaffarian et al., 2004), την στεφανιαία νόσο (Zaloga et al., 2006), με τη γήρανση και διάφορα είδη νεοπλασιών.

Οξειδωση Πρωτεϊνών

Μια ακόμα σημαντική δυσμενής επίπτωση των δραστικών μορφών οξυγόνου είναι η οξειδωση των πρωτεϊνών. Οι ROS οξειδώνουν τις πρωτεΐνες του αίματος αλλά και δομικές πρωτεΐνες με αποτέλεσμα την άμεση και έμμεση καταστροφή τους. Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τις ROS οδηγεί σε αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, στον θρυμματισμό και τον εκφυλισμό των πρωτεϊνών. Οι αλλαγές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davis, 1987; Grune et al., 1997; Halliwell and Gutteridge , 1999; Levine et al., 2000; Stadtman , 1986).

Οξείδωση DNA

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου μπορούν να προσβάλλουν το DNA αν και αυτό είναι ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο. Οι ROS μπορούν να προκαλέσουν καταστροφές όπως τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Η ρίζα υδροξυλίου αντιδρά με την γουανίνη στην θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν την 8-υδροξυγουανίνη. Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων (Ames, 1986; Dizdaroglu and Jaruga et al., 2002; Halliwell, 2001; Halliwell and Gutteridge, 1999; Helbock et al., 1999).



Εικόνα 3: Επιβλαβείς επιδράσεις ελευθέρων ριζών.

1.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικά χαρακτηρίζονται οι ουσίες οι οποίες μπορούν να παρεμποδίσουν τις αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών, να αδρανοποιήσουν τις ελεύθερες ρίζες ή να βοηθήσουν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες στον οργανισμό. Οι μηχανισμοί δράσης τους μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί. Η αντιοξειδωτική ουσία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Krinsky, 2002).

Η βασική διάκριση των αντιοξειδωτικών γίνεται με βάση:

- την προέλευσή τους σε εξωγενή και ενδογενή,
- τη διαλυτότητά τους σε υδρόφιλα και λιπόφιλα,
- τη χημική τους φύση σε ενζυμική και μη ενζυμική.

Υπάρχουν τόσο ενζυμικοί όσο και μη ενζυμικοί μηχανισμοί που εξουδετερώνουν ή ελέγχουν τη δράση των ελευθέρων ριζών. Αυτό επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους:

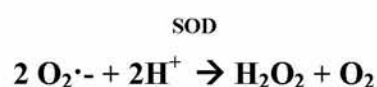
1. Εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών.
2. Μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια.
3. Βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

1.5.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Οι ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν την δράση ενδογενών ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

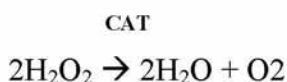
Το πιο σημαντικό ένζυμο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 :



Υπάρχουν διάφορες μορφές SOD στα βιολογικά συστήματα όπως η Cu-SOD στο κυτταρόπλασμα, η Mn-SOD στα μιτοχόνδρια, η Cu,Zn-SOD στο εξωκυττάριο υγρό και η Fe-SOD στα βακτήρια και τα φυτά.

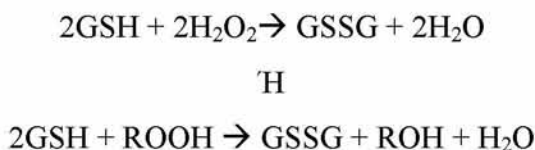
Καταλάση (CAT)

Η καταλάση εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες περιέχει και μία ομάδα αίμης στην ενεργό περιοχή τους. Καταλύει την μετατροπή του H₂O₂ σε νερό και οξυγόνο σύμφωνα με την αντίδραση:



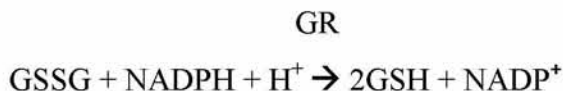
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά στο εξωτερικό του κυττάρου. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ανάγει τα υδροϋπεροξειδία (ROOH) σε αλκοόλες (ROH) και επίσης ανάγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό ενώ ταυτόχρονα προκαλεί την οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης.



Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγάση της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH και έτσι διατηρεί σε φυσιολογικά επίπεδα την αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Αποτελείται από δύο υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνιά του στη δισουλφιδική γέφυρα. Όπως φαίνεται και στην παρακάτω αντίδραση οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH.



1.5.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο αποτελούμενο από γ-γλουταμινικό, κυστεΐνη και γλυκίνη (γ-Glu-Cys-Gly) περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα και επειδή συντίθεται από τον οργανισμό δεν είναι απαραίτητο θρεπτικό συστατικό. Η σουλφυδρυλική κυστεΐνη λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων και είναι υπεύθυνη για τη βιολογική δραστηριότητα της γλουταθειόνης. Βασικός ρόλος της γλουταθειόνης είναι η διάσπαση και απομάκρυνση των εν δυνάμει επικίνδυνων τοξινών που εισέρχονται στον οργανισμό μας. Ακόμη, η GSH είναι το πιο σημαντικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό συμβάλλοντας στην προστασία κατά την οξειδωτικής βλάβης και παράλληλα ωφελεί και εξωγενή αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη E (Scholz RW et al, 1989).

Η γλουταθειόνη εκτός από αντιοξειδωτική δράση έχει πολλαπλές λειτουργίες:

- Μετέχει στον κύκλο μονοξειδίου του αζώτου.
- Παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του σιδήρου.
- Χρησιμοποιείται σε μεταβολικές και βιοχημικές αντιδράσεις, όπως στη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA, την πρωτεϊνική σύνθεση, τη σύνθεση των προσταγλανδινών, τη μεταφορά αμινοξέων και την ενεργοποίηση ενζύμων.

Έτσι, κάθε σύστημα του σώματος μπορεί να επηρεαστεί από τις συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης, ιδιαίτερα το ανοσοποιητικό σύστημα, το νευρικό σύστημα, το γαστρεντερικό σύστημα και οι πνεύμονες.

Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E αποτελείται από μια ομάδα λιποδιαλυτών βιταμινών με την α-τοκοφερόλη να είναι η πιο δραστική. Η λιποπρωτεΐνη αυτή βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις κυτταρικές μεμβράνες και στα μιτοχόνδρια. Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση της α-τοκοφερόλης περιλαμβάνει προστασία της βιταμίνης A από την οξείδωση και αναστέλλει την αντίδραση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων.

Βιταμίνη C

Μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη με σημαντική αντιοξειδωτική δράση είναι η βιταμίνη C η οποία είναι αποτελεσματική στα εξωκυτάρια υγρά και στο κυτταρόπλασμα (Bigard, 2001; Palmer et al., 2003). Είναι άφθονη σε ιστούς όπου η παραγωγή ROS είναι πιο σημαντική. Αυτό το φαινόμενο ορίζεται ως προσαρμογή

απέναντι στο οξειδωτικό στρες. Στα εξωκυττάρια υγρά, η βιταμίνη C έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει ROS ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{LOO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$) (Bigard, 2001). Ακόμη έχει την ικανότητα να παγιδεύει ιόντα χαλκού, τα οποία έχουν πολύ ισχυρή οξειδωτική δράση.

Β-καροτένιο και βιταμίνη A

Το β-καροτένιο βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες και ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στον οργανισμό μετατρέπεται σε βιταμίνη A. Η δράση του β-καροτενίου είναι η απενεργοποίηση των ROS και η μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, αν και ο μηχανισμός της δράσης του δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος (Powers & Lennon, 2000; Ozhogina & Kasaikina, 1995). Η αλληλεπίδραση του β-καροτενίου με τις βιταμίνες C και E προσφέρει προστασία στα κύτταρα από τις ROS (Livrea et al., 1995). Τέλος, παίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Συνένζυμο Q 10

Το συνένζυμο Q10 (CoQ10) είναι ένα ενδογενές μόριο απαραίτητο για τη σύνθεση ATP και βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Linnane et al., 2002; Maulic et al., 2000). Το CoQ10 είναι γνωστό ότι ενεργεί ως αντιοξειδωτικό με άμεση δράση απέναντι στις ρίζες υπεροξυλίου ή με έμμεση δράση αναγεννώντας τις βιταμίνες C και E (Witt et al., 1992; Crane, 2001). Το CoQ10 έχει επίσης ωφέλιμες επιδράσεις, όπως η προστασία απέναντι σε καρδιαγγειακές ασθένειες, καρκίνο και κυτταρική γήρανση ή απόπτωση.

Σελήνιο

Το σελήνιο είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο, που συμμετέχει στη διατήρηση της υγείας και την πρόληψη ασθενειών στον άνθρωπο. Η αντιοξειδωτική του δράση εμφανίζεται όταν αυτό λειτουργεί ως συμπάράγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στους ανθρώπους (Svensson et al., 2002; Grootveld & Halliwell, 1987; Hellsten et al., 1997). Η έντονη φυσική δραστηριότητα αυξάνει τις συγκεντρώσεις του ουρικού οξέος στο πλάσμα. Το ουρικό οξύ του πλάσματος διαχέεται στους μύες με σκοπό να τους προστατεύσει από οξείδωση προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες (Hellsten et al., 1998). Το ουρικό οξύ προστατεύει τα ερυθροκύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες, το

υαλουρονικό οξύ και το DNA από οξείδωση. Μια άλλη σημαντική αντιοξειδωτική ιδιότητα του ουρικού οξέος είναι η ικανότητά του να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου. Αυτή η διαδικασία εμποδίζει τον σίδηρο να δράσει προ-οξειδωτικά, την οξείδωση της βιταμίνης C και τη λιπιδική υπεροξείδωση (Davies et al., 1986; Sevanian et al., 1991).

1.6 Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών παραγόντων. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί τόσο από εξωγενείς παράγοντες (ξеноβιοτικές ουσίες, κάπνισμα, διατροφή κ.α.) όσο και από ενδογενείς (ένζυμα, ο αερόβιος μεταβολισμός στα μιτοχόνδρια κ.α.). Έτσι, η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών έχει ως αποτέλεσμα είτε να υπερπαραγονται ελεύθερες ρίζες είτε να παρατηρείται μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών και το οξειδωτικό στρες έχουν συνδεθεί με πλήθος παθολογικών καταστάσεων για τις οποίες θεωρούνται κατά ένα μέρος υπεύθυνες (Halliwell et al., 1992).

1.7 Πολυφαινόλες

Οι πολυφαινόλες είναι μια μεγάλη ομάδα φυτικών μεταβολιτών (Tsao, 2010) είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται κυρίως από φυσικές, καθώς και συνθετικές ή ημι-συνθετικές χημικές ουσίες (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouysegu, 2011). Μερικά από τα προϊόντα που περιέχουν πολυφαινόλες είναι τα φρούτα και τα λαχανικά, το πράσινο τσάι, το μαύρο τσάι, το κόκκινο κρασί, ο καφές, η σοκολάτα, οι ελιές, τα εσπεριδοειδή, η σόγια και το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο. Ακόμα, τα βότανα, τα μπαχαρικά, οι ξηροί καρποί και τα φύκη είναι πλούσια σε πολυφαινόλες (D'Archivio, Files, Vari, Sczzocchio, & Masella, 2010). Οι πολυφαινόλες ταξινομούνται σε διαφορετικές κατηγορίες (Manach et al.2005) αλλά δύο είναι οι κύριες ομάδες τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή.

1.7.1 Φλαβονοειδή

Έχουν μια κοινή δομή, που αποτελείται από δύο δακτυλίους, οποίοι ενώνονται μεταξύ τους με 3 άτομα άνθρακα σχηματίζοντας έναν οξυγονωμένο ετερόκυκλο. Έτσι, μπορούν να διαιρεθούν σε 6 υποκατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του ετερόκυκλου που εμπλέκεται. Αυτές είναι οι:

- φλαβονόλες,
- φλαβόνες,
- ισοφλαβόνες,
- φλαβανόνες,
- ανθοκυανιδίνες και
- φλαβανόλες (κατεχίνες, προανθοκυανιδίνες) (Manach et al. 2004; Han et al. 2007).

Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα βασίζεται στην δημιουργία συμπλόκων με τα μέταλλα και την δέσμευση των ελευθέρων ριζών. Τα φλαβονοειδή μειώνουν την δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών με την προσφορά ηλεκτρονίων από τους υποκαταστάτες του υδροξυλίου. Η διαφορά της δραστηριότητας των φλαβονοειδών οφείλεται στη διαφορά της προσφοράς των ηλεκτρονίων και των υποκαταστατών ΟΗ εξαιτίας της ποικιλομορφίας τους.

1.7.2 Μη φλαβονοειδή

Στην κατηγορία των μη φλαβονοειδών ανήκουν τα φαινολικά οξέα, οι λιγνάνες και τα στυλβένια. Τα φαινολικά οξέα χωρίζονται σε παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και του κινamikού οξέος (Manach et al. 2004). Τα φαινολικά οξέα όπως το καφεϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ παρουσιάζουν αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι λιγνάνες είναι μια από τις κατηγορίες των μη φλαβονοειδών και μελέτες δείχνουν ότι παρέχουν προστασία σε καρδιαγγειακές ασθένειες, στον καρκίνο, την οστεοπόρωση όμως δεν υπάρχουν σαφή ευρήματα (Adlercreutz, 2007). Τα στυλβένια είναι μια ακόμα κατηγορία μη φλαβονοειδών με πιο γνωστό στυλβένιο την ρεσβερατρόλη, η οποία βρίσκεται στο φλοιό των κόκκινων σταφυλιών, στα μούρα κ.α. (Soleas, Diamandis, & Goldberg, 1997). Μελέτες έχουν δείξει ότι η ρεσβερατρόλη έχει προστατευτική δράση εμποδίζοντας την εμφάνιση και την ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος καθώς και την εξέλιξη καρκίνου του μαστού σε ποντίκια. Ακόμα, η αντικαρκινική της δράση έχει δείξει και σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως κυττάρων μαστού, προστάτη και στόματος (Kampa et al. 2000, Ider et al.2000, Αποστολίδου 2016).

1.7.3 Οι επιδράσεις των πολυφαινολών στην υγεία

Οι πολυφαινόλες είναι μη θρεπτικά συστατικά που έχουν την ιδιότητα να παρεμβαίνουν στην απορρόφηση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και στην

δέσμευση πεπτικών ενζύμων και πρωτεϊνών. Το ποσό της πρόσληψής τους και η βιοδιαθεσιμότητά τους είναι αυτά που καθορίζουν τις επιπτώσεις τους στον οργανισμό και αυτός είναι ο λόγος που έχουν γίνει πολλές μελέτες για τις επιδράσεις των πολυφαινόλων (Mennen et al. 2005).

Έρευνες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά που αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και τις σταθεροποιούν. Με προσφορά ενός ηλεκτρονίου ή ενός ατόμου υδρογόνου καταστέλλουν τη διάδοση των ελεύθερων ριζών μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης, μέσω της αναστολής ή καταστολής των δραστικών μορφών οξυγόνου. Ακόμη, η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινόλων μπορεί να οφείλεται στην άμεση δέσμευση ριζών των αντιδράσεων υπεροξειδωσίας των λιπιδίων με σκοπό την διακοπή τους και την μετατροπή των πολυφαινόλων σε σταθερές και λιγότερο δραστικές ρίζες. Μια ακόμα δράση των πολυφαινόλων είναι η δέσμευση μετάλλων μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος Fe^{2+} με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της αντίδρασης Fenton και της οξειδωσίας από τις πολύ δραστικές ελεύθερες ρίζες. Τέλος, οι πολυφαινόλες δρουν ως συν-αντιοξειδωτικά συμβάλλοντας στην αναγέννηση βιταμινών και στην αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης, αλλά αυξάνουν και ενδογενή αντιοξειδωτικά όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση.

Η ικανότητα των πολυφαινόλων να μετατρέπονται σε ελεύθερες ρίζες όταν βρίσκονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε προ-οξειδωτική κατάσταση κάτι που φανερώνει την ανάγκη για περαιτέρω έρευνες. Η απαιτούμενη δοσολογία πολυφαινόλων που χρειάζεται ο κάθε οργανισμός ώστε να προκαλούν μόνο αντιοξειδωτική και όχι προοξειδωτική δράση διαφέρει και απαιτούνται μελέτες για την εξακρίβωσή του (Bouayed & Bohn 2010; Tsao 2010; Scalbert et al. 2005).

Οι πολυφαινόλες προστατεύουν από ασθένειες όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, η οστεοπόρωση αλλά και καρδιαγγειακές νόσους και νευροεκφυλιστικές, σύμφωνα με μελέτες σε ζώα και ανθρώπινα καλλιεργούμενα κύτταρα. Επιπλέον ευεργετικές επιδράσεις τους στην υγεία του ανθρώπου είναι η μείωση της πιθανότητας πρόκλησης καρδιαγγειακών ασθενειών, ηπατικών ασθενειών, παχυσαρκίας, αθηροσκλήρωσης, διαφόρων αλλεργιών και ασθενειών του γαστρεντερικού σωλήνα (Rodrigo et al. 2014; Bouayed et al. 2011).

1.8 Conium divaricatum

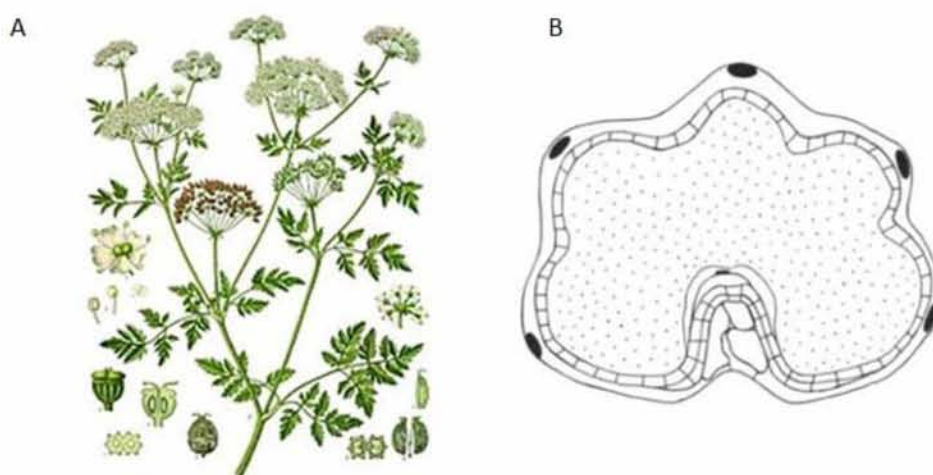
Το *Conium divaricatum* είναι μία μονοετής ή διετής πόα με κυλινδρικό βλαστό, κοίλο στο εσωτερικό του. Ο βλαστός είναι αραιά διακλαδισμένος, συνήθως χωρίς τα χαρακτηριστικά στίγματα, με τα κατώτερα φύλλα όχι τόσο διαιρεμένα και με ορισμένα τμήματα αδιαίρετα. Τα άνθη του είναι λευκά και τοποθετούνται σε 6-15 ακτίνες. Ο καρπός του *Conium divaricatum* εξωτερικά φαίνεται να είναι ωοειδής, μήκους 3-3,5mm και πλάτους 1,5mm, με τις πλευρές των μεριστόκαρπων του να είναι πεπλατυσμένες και όχι κυματιστές (Βλάσση, 2016).

Αυτό που χαρακτηρίζει χημικά το γένος *Conium*, είναι η ύπαρξη αλκαλοειδών. Στο γένος *Conium* περιέχονται πιπεριδινικά αλκαλοειδή, με δύο από αυτά, τη κωνειΐνη και τη γ-κωνικεΐνη, να εμφανίζονται συνήθως σε μεγαλύτερες ποσότητες. Όπως και οι περισσότεροι αντιπρόσωποι της οικογένειας *Apiaceae*, το γένος *Conium* φέρει πτητικά συστατικά. Από το φυτό έχουν αναφερθεί επιπλέον στεροειδή, φλαβονοειδή, κουμαρίνες και πολυακετυλένια. Το κώνειο σημειώνει αναλγητική, αντιμικροβιακή, αντιπαρασιτική, αντιφλεγμονώδης δράση καθώς και κυτταροτοξική δράση (Βλάση, 2016). Το *Conium divaricatum* απαντάται στον ελλαδικό χώρο, σε διάφορες περιοχές της χώρας. Είθισται να φυτρώνει σε χέρσες εκτάσεις με πετρώδες υπόστρωμα, σε άκρες δρόμων, σε ερείπια και ορισμένες φορές σε ανθρωπογενείς τόπους (Καββαδάς, 1956, Βλάση, 2016).

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες γίνονται γύρω από τις βιολογικές δράσεις του *Conium*. Μελέτες δείχνουν την αναλγητική του δράση με αποτέλεσμα την ανακούφιση του πόνου μετά την χορήγηση κωνειΐνης σε πειραματόζωα όπου μετά από τη διεξαγωγή κατάλληλων δοκιμών, οι μύες επέδειξαν αυξημένη αντοχή στον πόνο. (Arihan et al. 2009). Επίσης, το αιθέριο έλαιο, αλλά και εκχυλίσματα του *Conium*, βρέθηκε ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη διαφόρων βακτηρίων και μυκήτων. Συγκεκριμένα το αιθέριο έλαιο εμποδίζει αποτελεσματικά την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus parasiticus*, υπεύθυνου για την παραγωγή ηπατοτοξικών και καρκινογόνων ουσιών (Razzaghi-Abyaneh et al., 2009). Το αιθανολικό εκχύλισμα αποδείχθηκε τοξικό έναντι του μύκητα *Candida albicans*, υπεύθυνου για λοιμώξεις όπως οι κολπίτιδες (Ozcelik et al., 2004). Τέλος, μελέτες αναφέρουν ότι τα αλκαλοειδή που παρελήφθησαν στο χλωροφορμικό εκχύλισμα υπέργειων τμημάτων *Conium*, προκάλεσαν θεαματική μείωση σε οίδημα που είχε

δημιουργηθεί πειραματικά σε πέλμα μυών, μείωση παρόμοιου μεγέθους με αυτή που προκάλεσε το χορηγούμενο πρότυπο φάρμακο. (Madaan & Kumar, 2012).

Σε πειράματα που έχουν διεξαχθεί πρόσφατα, αναδεικνύεται η ενδεχόμενη αντικαρκινική δράση του κώνειου. Συγκεκριμένα, σε μελέτη αιθανολικού εκχυλίσματος του *Conium* έναντι της κυτταρικής σειράς HeLa (Mondal et al. 2014), παρατηρήθηκε σημαντική κυτταροτοξικότητα. Η χορήγηση του εκχυλίσματος μείωσε την βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων μέσω της αύξησης της παραγωγής ελευθέρων ριζών (ROS), της εκπόλωσης της κυτταρικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, της παραγωγής πρωτεϊνών που οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση και διαφόρων άλλων παραγόντων. Το εκχύλισμα του κωνείου επίσης μείωσε την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων, διακόπτοντας τον κυτταρικό κύκλο και προκάλεσε δομικές αλλαγές στη διπλή έλικα τόσο του DNA των HeLa κυττάρων, όσο και του ciDNA, γενετικό υλικό όγκου που κυκλοφορεί ελεύθερο στο αίμα καρκινοπαθών (Mondal et al. 2014).



Εικόνα 4: A. *Conium divaricatum*,
B. Εγκάρσια τομή ώριμου καρπού *Conium divaricatum*.

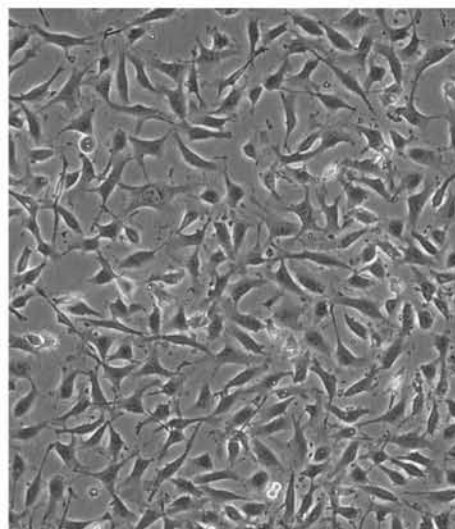
1.9 Ενδοθηλιακά κύτταρα

Το ενδοθήλιο απλώνεται σε όλο το αγγειακό σύστημα και αποτελείται από μια στοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ενδοθηλιακή κυτταρική δομή και η λειτουργική ακεραιότητα είναι σημαντικές στη διατήρηση του αγγειακού τοιχώματος και της κυκλοφοριακής λειτουργίας. Εκτός από το ρόλο τους ως ένας επιλεκτικός φραγμός διαπερατότητας, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ικανά να επιτελούν μια ποικιλία

μεταβολικών και συνθετικών λειτουργιών. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αντιδρούν σε φυσικά και χημικά ερεθίσματα στην κυκλοφορία και ρυθμίζουν την ομοιόσταση, τις ανοσοποιητικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Η κυτταρική βλάβη του ενδοθηλίου είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών παθολογικών καταστάσεων όπως της αθηροσκλήρωσης, της απώλειας της λειτουργίας της μεμβράνης και της θρόμβωσης (Sumpio et al., 2002).

Η εμφάνιση της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των αγγειακών ασθενειών και θεωρείται ως η αρχή της αθηροσκλήρωσης. Η δυσλειτουργία αυτή εμφανίζεται σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, σακχαρώδη διαβήτη, υπέρταση καθώς και σε καπνιστές. Ο κύριος μηχανισμός της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας είναι η αύξηση των ριζών οξυγόνου οι οποίες μειώνουν την παραγωγή και τη δραστηριότητα του μονοξειδίου του αζώτου μέσω διαφόρων μηχανισμών (Κολιάκου, 2018).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά EA.hy926, πρόκειται για μία υβριδική σειρά που προέκυψε από τη σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (HUVECs) και επιθηλιακών κυττάρων από ανθρώπινο καρκίνωμα πνεύμονα (A549). Η κυτταρική σειρά που προέκυψε διαθέτει πολλές ιδιότητες των ενδοθηλιακών κυττάρων και μπορεί να αναπτύσσεται ταχύτατα χωρίς την προσθήκη κάποιου ειδικού παράγοντα ανάπτυξης. Οι ιδιότητες αυτές καθιστούν την εν λόγω κυτταρική σειρά χρήσιμη για τη μελέτη των ενδοθηλιακών κυττάρων του ανθρώπου (Bauer J. et al, 1992).



Εικόνα 5: Ενδοθηλιακά κύτταρα.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην μελέτη της αντιοξειδωτικής επίδρασης του εκχυλίσματος *Conium divaricatum* σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις σε ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου EA.hy926. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκαν δείκτες οξειδωτικού στρες με κυτταρομετρία ροής αλλά και φασματοφωτομετρία.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά

3.1.1 Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προϊόντα των εταιρειών Gibco, Sigma-Aldrich και Becton-Dickinson.

3.1.2 Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος

Το τελικό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων τύπου EA.hy 926 περιείχε θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, 25mM Hepes, Gilbo BRL 41966), L-γλουταμίνη 2mM (Biochrom KG Seromed), αντιβιοτικά Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (antibiotic-antimitotic solution, Gilbo) και Fetal Bovine Serum (Biochrom KG Seromed).

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής δύο θρεπτικά μέσα:

1. Θρεπτικό μέσο με 10% FBS, για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που περιείχε 500ml DMEM41966, 50mlFBS, 5ml pen/str, 5ml Γλουταμίνη.
2. Θρεπτικό μέσο χωρίς FBS, στο στάδιο της πρόσθεσης των διαφορετικών συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων από στέμφυλα που περιείχε 500ml DMEM41966, 5ml pen/str, 5ml Γλουταμίνη.

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των κυττάρων:

- I. Τρυψίνη 0.25% (Gibco),
- II. PBS pH 7.4 (Phosphate buffer saline 1x)(Gibco)
- III. Χρωστική Orange mercury (Sigma)
- IV. Χρωστική DCF (Sigma)
- V. Cell Proliferation kit II (XTT) (Sigma)

3.1.3 Καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy 926

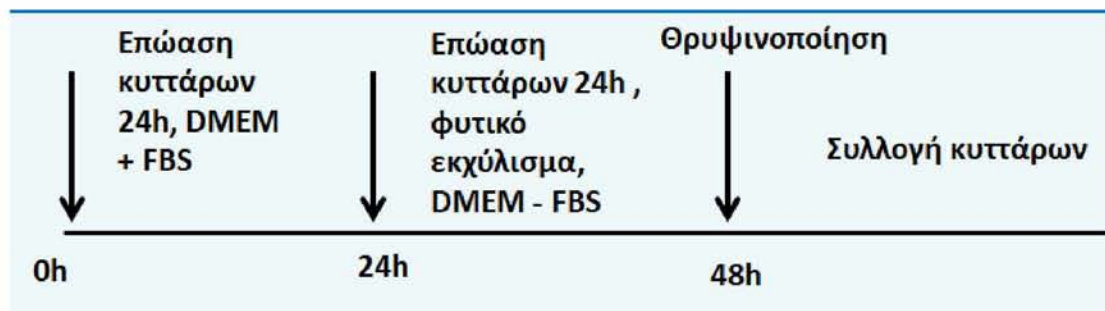
Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αναπτύχθηκαν σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml)] και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO₂ στο 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της

φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα. Τότε κάναμε επανακαλλιέργεια των κυττάρων (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 0,5mL τρυψίνης 0,25%. Ακολουθεί επώαση με την τρυψίνη για 5 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόταν σε ειδικό θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (Laminar air flow).

3.1.4 Πειραματικός σχεδιασμός

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 καλλιεργήθηκαν σε 25cm² φλάσκες καλλιέργειας για τον προσδιορισμό της GSH και των ROS και σε 75cm² φλάσκες καλλιέργειας για τον προσδιορισμό των TBARS, της TAC και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων με θρεπτικό υλικό DMEM (5ml για τις 25cm² φλάσκες και 10ml για τις 75cm² φλάσκες), το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS, για 24h στους 37°C σε 5% CO₂. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS το οποίο περιέχει εκχύλισμα *Conium divaricatum* στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (50, 25, 12 και 6μg/mL). Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS.

Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη (500μl για τις 25cm² φλάσκες και 1ml για τις 75cm² φλάσκες) (0.25%), επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί πλύση των κυττάρων με PBS σε αναλογία 1:1 (0,01 M με pH 7,4) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε PBS (0,01 M με pH 7,4). Για τον προσδιορισμό των TBARS, της TAC και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο PBS έχουν προστεθεί αναστολείς πρωτεασών (CompleteTM mini protease inhibitors, Roche) και ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπερήχους για 30sec σε περιοδικά διαστήματα των 10sec.



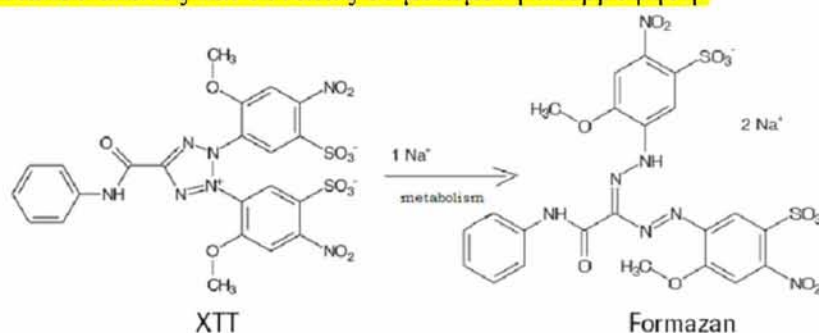
Εικόνα 6: Πειραματικός σχεδιασμός.

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράση του εκχυλίσματος *Conium divaricatum* με τη μέθοδο XTT

3.2.1.1 Αρχή μεθόδου XTT

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του εκχυλίσματος *Conium divaricatum* στη κυτταρική σειρά EA.hy926 χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες των κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά με τον σχηματισμό της φορμαζάνης, η οποία έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500nm. Η μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



Εικόνα 7: Μετατροπή XTT σε φορμαζάνη.

3.2.1.2 Πειραματική διαδικασία μεθόδου XTT

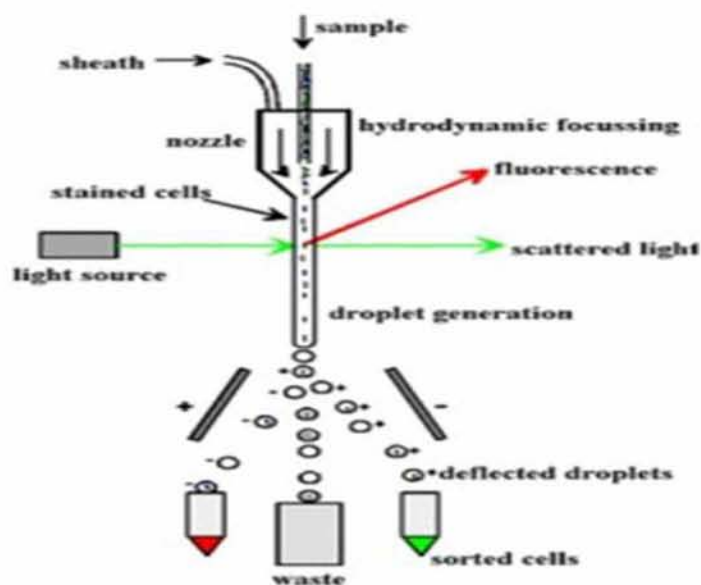
Η πειραματική διαδικασία ξεκινά με την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και την μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, προστίθενται 10.000 κύτταρα/θέση σε ένα «πιάτο» με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα προστίθενται θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του ειδικού «πιάτου» καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρούνταν και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με το εκχύλισμα) συνολικού όγκου 100μl και ακολουθεί επώαση για 24 ώρες. Μετά την επώαση προστίθενται 50μl από το αντιδραστήριο XTT σε κάθε θέση του 96-well plate και ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες. Το αντιδραστήριο XTT πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων A και B από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των A και B, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του.

Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT reagent. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν το εκχύλισμα και XTT, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση του εκχυλίσματος έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή του εκχυλίσματος στην κυτταρική αύξηση των EA.hy926 υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα} - O.D. \text{ δείγματος}) / O.D. \text{ αρνητικού μάρτυρα}] \times 100.$$

3.2.2 Προσδιορισμός της ενδογενούς γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου (Shapiro, 2003). Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Η δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού.



Εικόνα 8 : Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδαρίζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης).

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα-ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδίοδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system).

Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον

τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο). Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.



Εικόνα 9: Κυτταρόμετρο ροής.

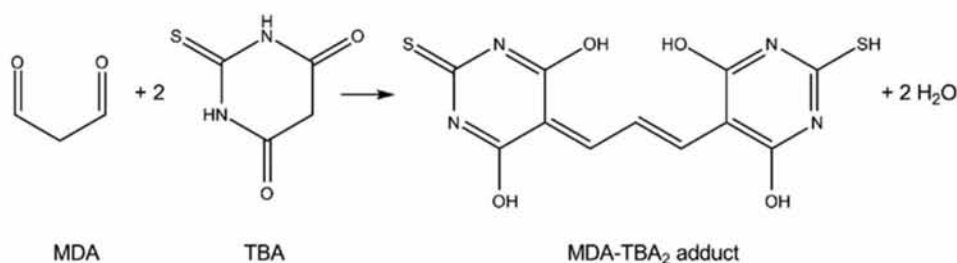
3.2.2.1 Πειραματική διαδικασία

Μετά τη συλλογή των δειγμάτων ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 150μL PBS και 15μL χρωστικής mercury orange ή 15μL χρωστικής DCF για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης ή των ελευθέρων ριζών, αντίστοιχα. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 37°C και σε 5% CO₂. Έπειτα, ξεπλένουμε με 250μL PBS και φυγοκεντρούμε στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, προστίθεται 250μL PBS και προχωράμε στην ανάλυση.

3.2.3 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης

3.2.3.1 Αρχή μεθόδου

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μηλονική διαλδεύδη (MDA). Η μηλονική διαλδεύδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Έτσι, τα TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μηλονικής διαλδεύδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία 1/2 αντίστοιχα. Η μέτρηση της μηλονικής διαλδεύδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσης των λιπιδίων.



Εικόνα 10: Αρχή μεθόδου TBARS.

3.2.3.2 Πειραματική διαδικασία

Υπολογίζονται 100μg πρωτεΐνης ανά ml για τα δείγματα με την μέθοδο Bradford. Προσθέτουμε τα μl του κυτταρολύματος για τα δείγματα και για τα τυφλά προσθέτουμε 50μl PBS, στην συνέχεια προστίθενται 500μL TCA 35% και 500μL Tris-HCL (200mM, pH 7.4) και ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1ml Na₂SO₄(2M)-TBA(55mM) και τα δείγματα επώαστηκαν στους 95⁰C για 45 λεπτά.

Ακολούθησε μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο για 5 λεπτά και έπειτα αφού προστέθηκε 1mL TCA 70%, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15000g για 3 λεπτά και η απορρόφηση του υπερκείμενου μετρήθηκε στα 530nm.

Τα δείγματα χωρίς το κυτταρικό αιώρημα αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα επίσης κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν και η μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης.

3.2.3.3 Υπολογισμοί

Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TBARS (nmol / mg πρωτεΐνης)} = [(A_{\delta} - A_0) / 0,156] \times B / C_{\delta}$$

A_{δ} : Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A_0 : Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

Τιμή 0,156: Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της μηλονικής διαλδεύδης.

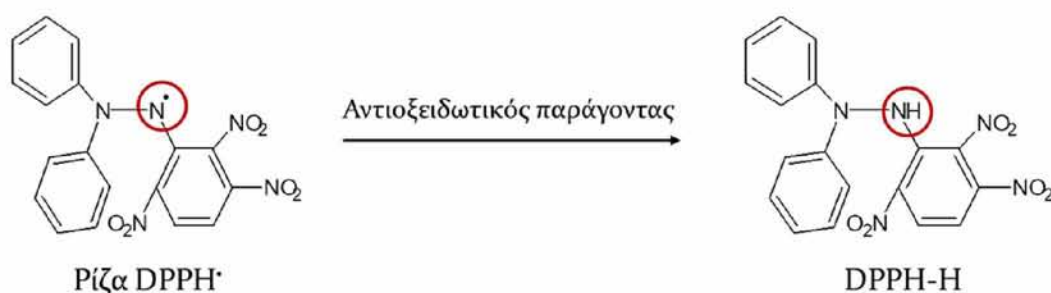
B : Τα μL του κυτταρικού αιωρήματος που χρησιμοποιήθηκαν.

C_{δ} : Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

3.2.4 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

3.2.4.1 Αρχή μεθόδου

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του προς εξέταση δείγματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης όλου του προς εξέταση δείγματος. Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση των συστατικών του δείγματος με την ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH^{\bullet}). Η παρουσία ενός ατόμου υδρογόνου ανάγει τη ρίζα DPPH^{\bullet} στην αντίστοιχη υδραζίνη. Η υδρανίζη που σχηματίζεται υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά και απορροφά στα 520nm.



Εικόνα 11: Αρχή μεθόδου TAC.

3.2.4.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά με την μέθοδο Bradford μετράται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του κυτταρολύματος. Για τα δείγματά μας υπολογίζουμε $100\mu\text{g}$ πρωτεΐνης ανα mL . Η αντίδραση πραγματοποιείται σε όγκο 1mL στον οποίο περιέχονται τα $x\mu\text{L}$ κυτταροπλασματικού αιωρήματος, $(500-x)\mu\text{L}$ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών

καλίου, νατρίου (pH 7.4, 10mM) και 500μl διαλύματος ρίζας DPPH[•] 0,1mM (50μM τελική συγκέντρωση ρίζας). Τα τυφλά δείγματα περιέχουν μόνο 500μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7.4, 10mM) και 500μl διαλύματος ρίζας DPPH[•] 0,1mM (50μM τελική συγκέντρωση ρίζας). Όλα τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται για 1ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Ακολουθεί φυγοκέντρωση των δειγμάτων στα 20000g για 3min και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Τα δείγματα που περιέχουν μόνο τη ρίζα στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH 7,4) αποτελούν το μάρτυρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

3.2.4.3 Υπολογισμοί

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται ως τα μmoL της ρίζας DPPH[•] που ανάγεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) από τα αντιοξειδωτικά συστατικά του κυτταροπλασματικού αιωρήματος ανά mg της πρωτεΐνης του δείγματος. Η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα και υπολογίζεται με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TAC } (\mu\text{mol DPPH}^{\bullet} / \text{mg πρωτεΐνης}) = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 0,05 \times 20 / C_{\delta}$$

A_{blank} : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του μάρτυρα.

A_{sample} : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

Τιμή 0,05: Η συγκέντρωση μmol /ml ρίζας DPPH[•] στην αντίδραση.

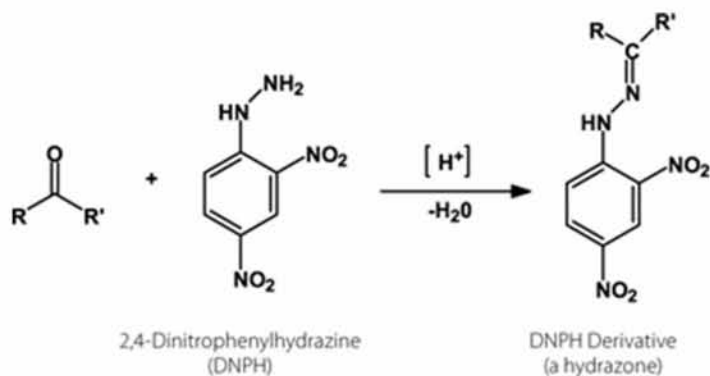
Τιμή 20: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος (Vτελ.αντίδρασης/ μl αιωρήματος [1000 μl /20 μl]).

C_{δ} : Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστήριου Bradford.

3.2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

3.2.5.1 Αρχή μεθόδου

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε οξειδωτικές βλάβες, έτσι είναι ένας από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους δείκτες πρωτεϊνικής οξείδωσης. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας γενικός και αξιόπιστος δείκτης της οξείδωσης των πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται ευρέως, διότι τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια. Καρβονυλικές ομάδες, όπως οι αλδεΐδες και οι κετόνες δημιουργούνται στην πλευρική πρωτεϊνική αλυσίδα κυρίως της προλίνης, της αργινίνης, της λυσίνης και της θρεονίνης. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλδραζονίου).



Εικόνα 12 : Αρχή μεθόδου CARBs.

3.2.5.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά με την μέθοδο Bradford μετρήθηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης του κυτταρολύματος. Υπολογίζονται 100μg πρωτεΐνης ανά ml από το κάθε δείγμα (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του), προστίθενται 500μL DNPH 10mM (διαλυμένο σε 2.5N HCL) για τα δείγματα ή 500μL 2.5N HCL για τα τυφλά. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 1 ώρα στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου με μια ανάδευση μετά από 30 λεπτά και στο τέλος φυγοκέντρωση στα 15000g για 5min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 1ml 10% TCA. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρωση στα 15000g για 5min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1ml μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) ενώ γίνεται φυγοκέντρωση στα 15000g για 5min στους 4°C. Το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται δύο ακόμη φορές. Στο τέλος προστίθενται 1mL 5M ουρίας (pH 2.3)

και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 15min. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 15000g για 3min στους 4°C και μέτρηση της απορρόφησης στα 370nm.

3.2.5.3 Υπολογισμοί

Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Protein carbonyls (nmol/mg protein)} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / 0.022 \times 5] / C\delta.$$

Abs_{sample}: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

Abs_{blank}: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του τυφλού.

0.022 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH

Τιμή 5: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος Ντελ.αντίδρασης/ μL πλάσματος [1000 μL /200 μL]).

Cδ: Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

3.2.6 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595nm (Bradford, 1976). Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10mg/mL ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400μg/mL. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20μL διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford.

Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20μL PBS και 1mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 50-1400 αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20μl προστίθενται κάθε φορά σε 1mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

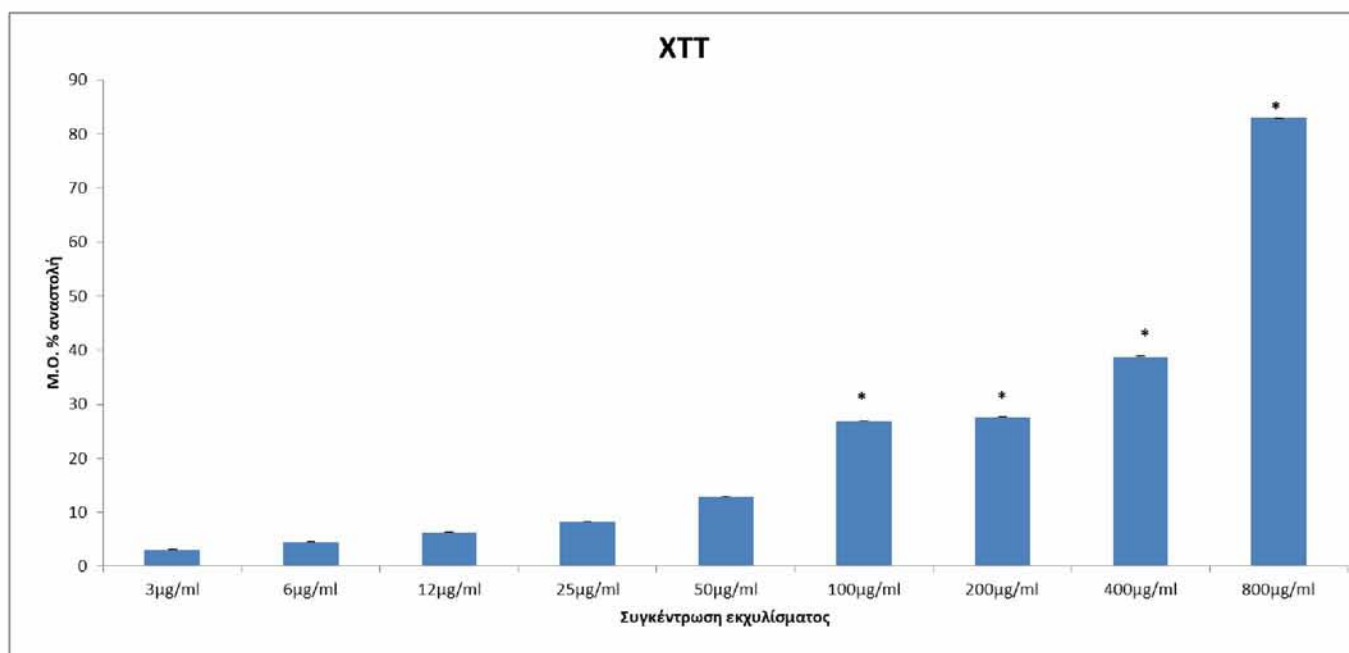
3.2.7 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω ανάλυσης του τεστ του Tukey. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0.05$. Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $\text{mean} \pm \text{SEM}$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος *Conium divaricatum* με τη μέθοδο XTT

Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται η κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος *Conium divaricatum* σε διάφορες συγκεντρώσεις για τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική κυτταροτοξική δράση στη συγκέντρωση των 100μg/ml, καθώς και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.



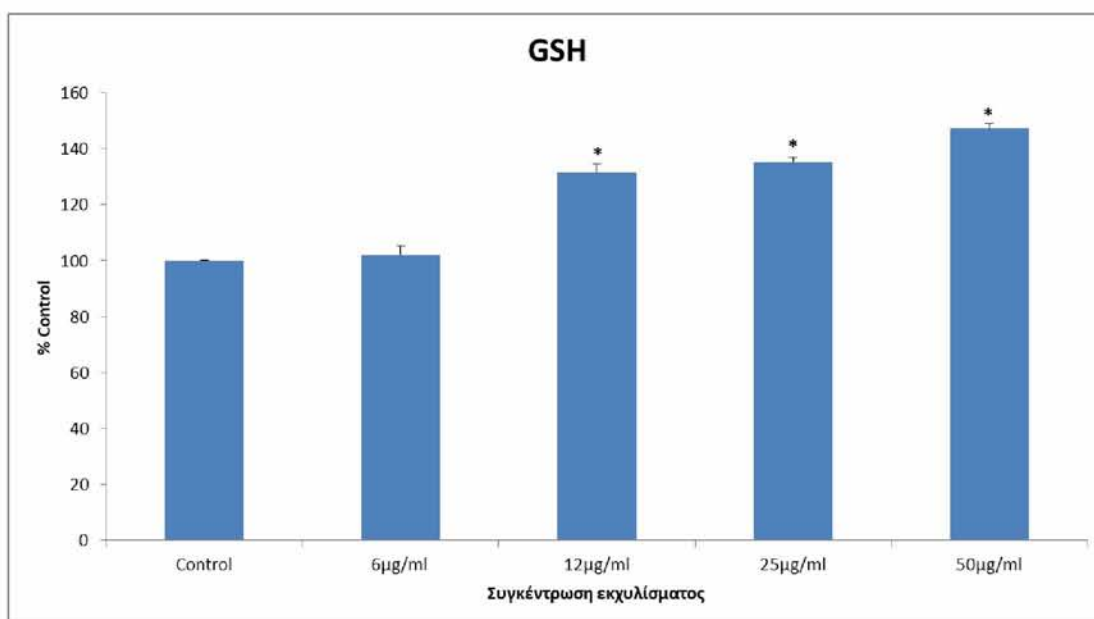
Γράφημα 1 : Αποτελέσματα XTT.

4.2 Προσδιορισμός της ενδογενούς γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών με κυτταρομετρία ροής

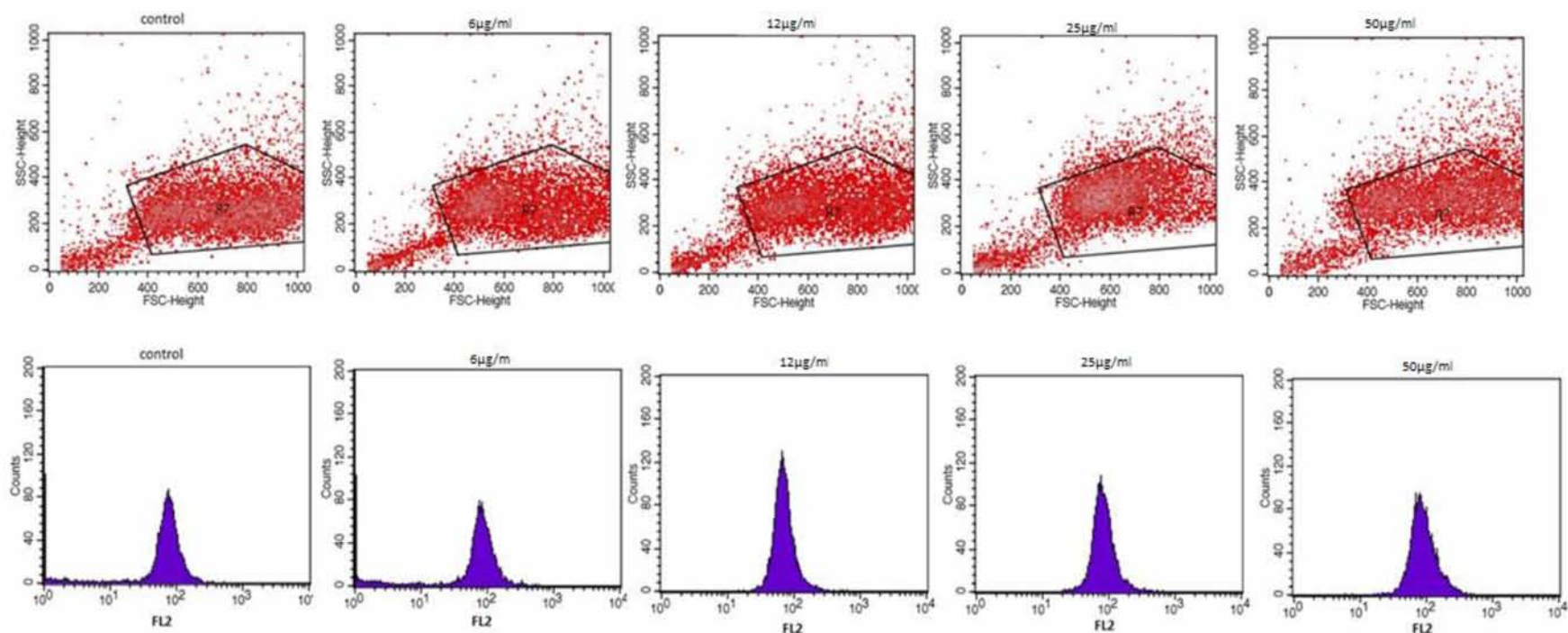
4.2.1 Προσδιορισμός γλουταθειόνης

Τα επίπεδα της GSH προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής, με τη χρήση της χρωστικής mercury orange. Ιστογράμματα που παρουσιάζουν το μέγεθος (FSC) και την κοκκίωση (SSC) των κυττάρων για τα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και την ένταση φθορισμού της χρωστικής mercury orange παρουσιάζονται στο γράφημα. Η μέση ένταση φθορισμού επεξεργάστηκε με το λογισμικό BD Cell Quest και οι τιμές παρουσιάζονται ως εκατοστιαία ποσοστά ως προς το control.

Τα επίπεδα της GSH στα κύτταρα αυξήθηκαν κατά 31,69%, 35,24% και 47,26% σε σχέση με τα επίπεδα της GSH στο δείγμα control, για τις συγκεντρώσεις 12, 25 και 50μg εκχυλίσματος/ml αντίστοιχα (Γράφημα2). Στην συγκέντρωση των 6μg/ml δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στα επίπεδα της ενδογενούς γλουταθειόνης.



Γράφημα 2: Αποτελέσματα της μεθόδου κυτταρομετρία ροής για τα επίπεδα της GSH.



Γράφημα 3: Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy 926 για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης (GSH).

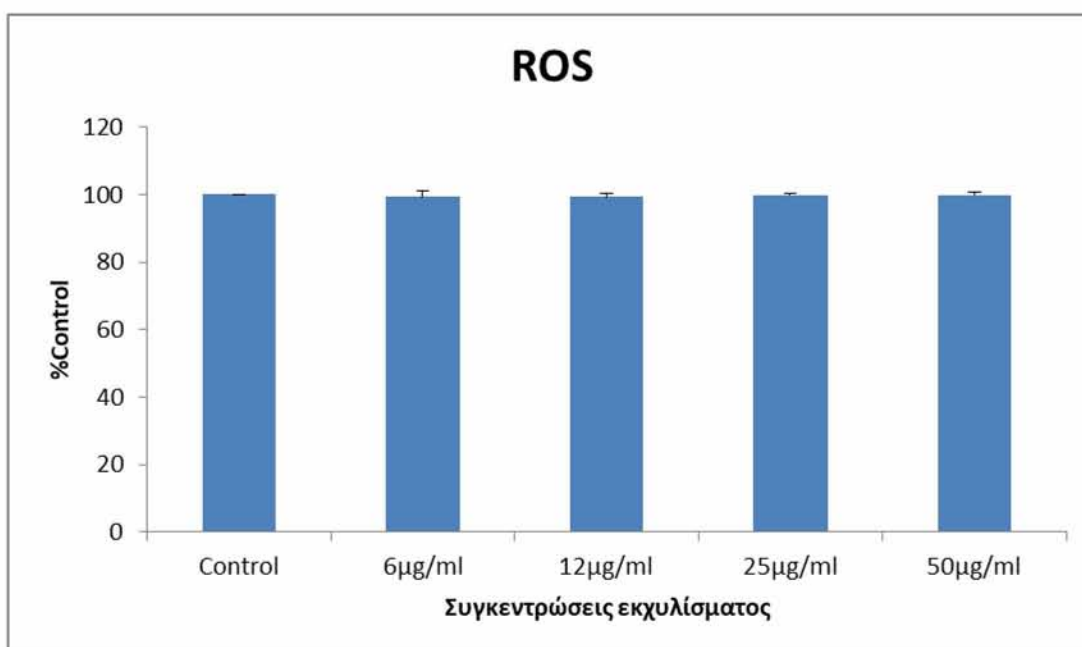
(Α) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και

(Β) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με τον φθορισμό τους (10.000 κύτταρα).

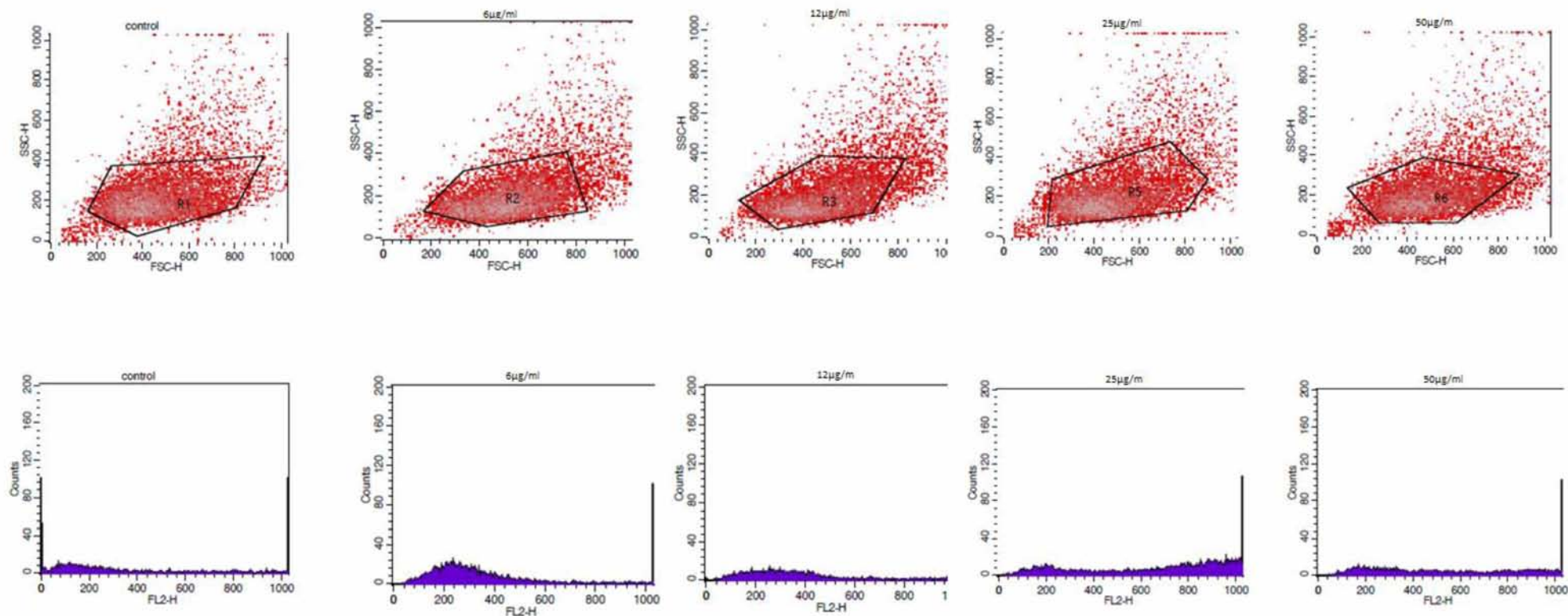
Το FL2 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488 και 580nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις : υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και σε συγκεντρώσεις 6, 12, 25 και 50μg/ml.

4.2.2 Προσδιορισμός ROS

Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν επίσης τα επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στη κυτταρική σειρά EA.hy926 έπειτα από επώαση με το εκχύλισμα για 24 ώρες. Ακόμη προσδιορίστηκαν τα επίπεδα ROS των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control). Η μέση ένταση φθορισμού επεξεργάστηκε με το λογισμικό BD Cell Quest και οι τιμές παρουσιάζονται ως εκατοστιαία ποσοστά ως προς το control. Όπως φαίνεται και στο γράφημα, τα επίπεδα των ROS στα κύτταρα έπειτα από επεξεργασία των κυττάρων με το εκχύλισμα δεν παρουσίασαν κανένα στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα σε καμία από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν.



Γράφημα 4: Αποτελέσματα της μεθόδου κυτταρομετρία ροής για τα επίπεδα των ROS.



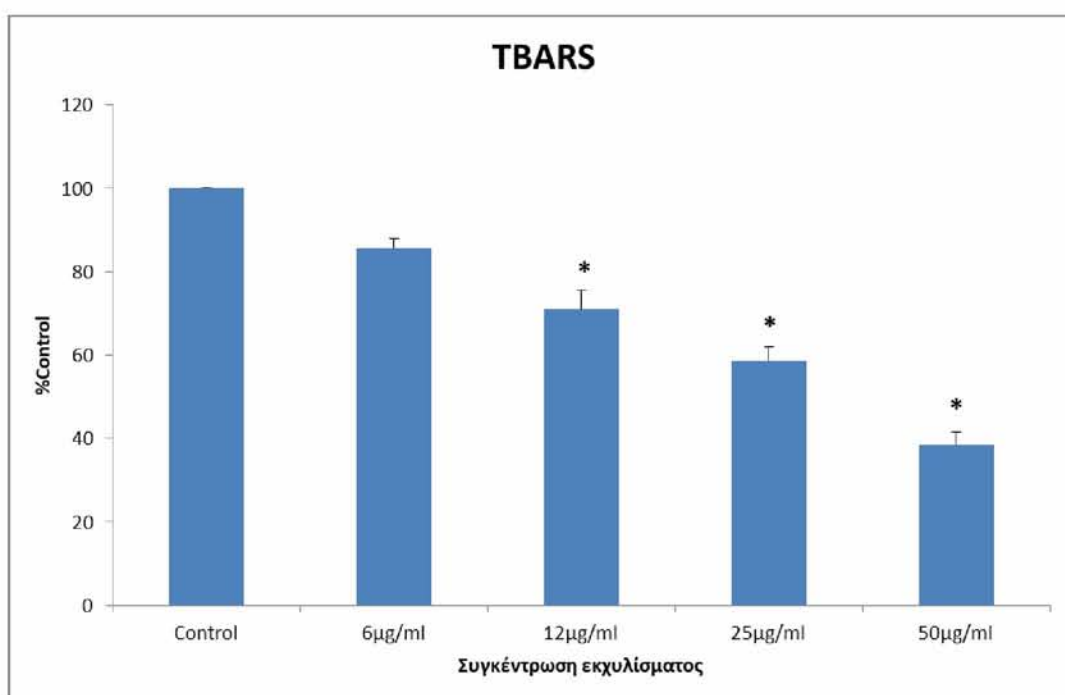
Γράφημα 5: Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy 926 για τον προσδιορισμό των ελευθέρων ριζών (ROS).

- (Α) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) σε συνάρτηση με το μέγεθος (FSC) των κυττάρων και
 (Β) Ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με τον φθορισμό τους (10.000 κύτταρα).

Το FL1 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση φθορισμού χρησιμοποιώντας τα 488 και 530nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. Τα κύτταρα μελετήθηκαν κάτω από πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις : υπό φυσιολογικές συνθήκες (control) και σε συγκεντρώσεις 6, 12, 25 και 50μg/ml.

4.3 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης

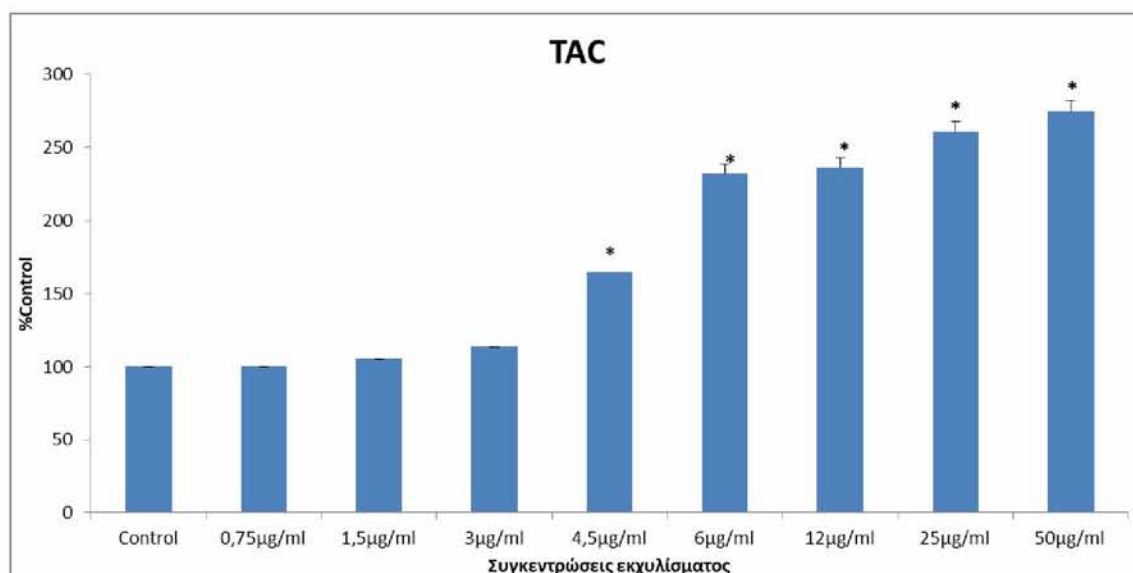
Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των TBARS έπειτα από επεξεργασία των κυττάρων με το εκχύλισμα αλλά και τα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξείδωσης υπό φυσιολογικές συνθήκες (control). Παρατηρείται μείωση της λιπιδικής υπεροξείδωσης και στις 4 επιλεγμένες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις με στατιστικώς σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις 12, 25, και 50μg/ml.



Γράφημα 6: Αποτελέσματα της λιπιδικής υπεροξείδωσης.

4.4 Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

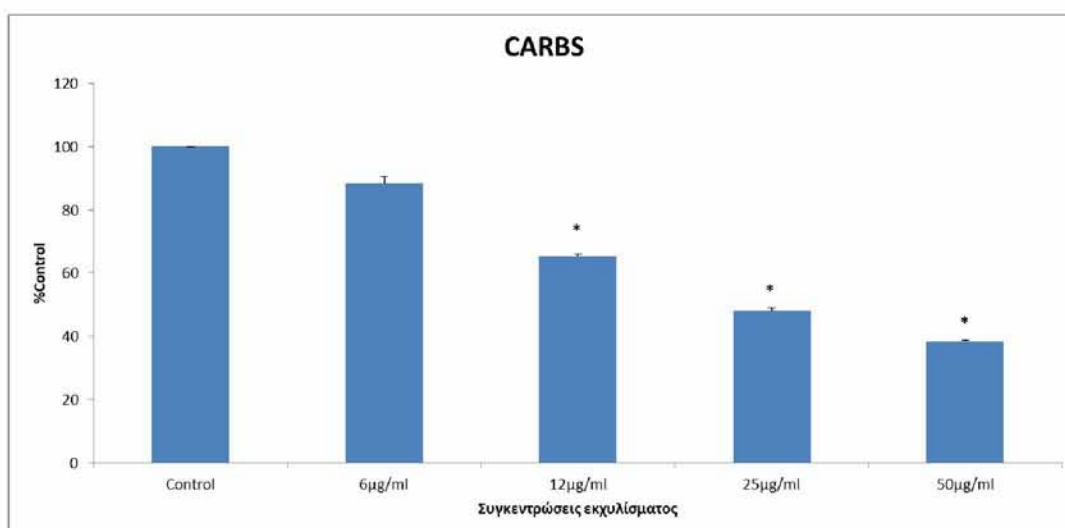
Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της TAC έπειτα από επεξεργασία των κυττάρων με το εκχύλισμα αλλά και τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας υπό φυσιολογικές συνθήκες (control). Παρατηρείται στατιστικώς σημαντική αύξηση της TAC στα 4,5, 6, 12, 25 και 50μg/ml.



Γράφημα 7: Αποτελέσματα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

4.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των CARBs έπειτα από επεξεργασία των κυττάρων με το εκχύλισμα αλλά και τα επίπεδα της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control). Παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και στις 4 επιλεγμένες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις με στατιστικώς σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις 12, 25, και 50μg/ml.



Γράφημα 8: Αποτελέσματα της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παραγωγή και χρήση τροφών φυτικής προέλευσης πλούσιων σε πολυφαινόλες κερδίζει ολοένα και περισσότερο το ενδιαφέρον των καταναλωτών τα τελευταία χρόνια. Η αιτία είναι οι σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες που αποδίδονται στις πολυφαινόλες και στον ρόλο τους στην πρόληψη ασθενειών που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες.

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η ανισορροπία μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών παραγόντων. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί τόσο από εξωγενείς όσο και από ενδογενείς παράγοντες. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών και το οξειδωτικό στρες έχουν συνδεθεί με πλήθος παθολογικών καταστάσεων για τις οποίες θεωρούνται κατά ένα μέρος υπεύθυνες (Halliwell et al., 1992). Μερικές από τις ασθένειες αυτές είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο καρκίνος, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, η αθηροσκλήρυνση, η πρόωγη γήρανση κ.α.

Οι πολυφαινόλες είναι μια μεγάλη ομάδα φυτικών μεταβολιτών (Tsao, 2010) είναι μη θρεπτικά συστατικά που έχουν την ιδιότητα να παρεμβαίνουν στην απορρόφηση απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και στην δέσμευση πεπτικών ενζύμων και πρωτεϊνών. Το ποσό της πρόσληψής τους και η βιοδιαθεσιμότητά τους είναι αυτά που καθορίζουν τις επιπτώσεις τους στον οργανισμό και αυτός είναι ο λόγος που έχουν γίνει πολλές μελέτες για τις επιδράσεις των πολυφαινολών (Mennen et al. 2005). Έρευνες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά που αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και τις σταθεροποιούν.

Η ενδοθηλιακή κυτταρική δομή και η λειτουργική ακεραιότητα είναι σημαντικές στη διατήρηση του αγγειακού τοιχώματος και της κυκλοφοριακής λειτουργίας. Εκτός από το ρόλο τους ως ένας επιλεκτικός φραγμός διαπερατότητας, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ικανά να επιτελούν μια ποικιλία μεταβολικών και συνθετικών λειτουργιών. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αντιδρούν σε φυσικά και χημικά ερεθίσματα στην κυκλοφορία και ρυθμίζουν την ομοιόσταση, τις ανοσοποιητικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις. Η κυτταρική βλάβη του ενδοθηλίου είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών παθολογικών καταστάσεων όπως της αθηροσκλήρωσης, της απώλειας της λειτουργίας της μεμβράνης και της θρόμβωσης (Sumpio et al., 2002).

Το *Conium divaricatum* είναι μία μονοετής ή διετής πόα με κυλινδρικό βλαστό, κοίλο στο εσωτερικό του (Βλάσση, 2016). Αυτό που χαρακτηρίζει χημικά το γένος *Conium*, είναι η ύπαρξη αλκαλοειδών. Στο γένος *Conium* περιέχονται πιπεριδινικά αλκαλοειδή, με δύο από αυτά, τη κωνειΐνη και τη γ-κωνικεΐνη, να εμφανίζονται συνήθως σε μεγαλύτερες ποσότητες. Όπως και οι περισσότεροι αντιπρόσωποι της οικογένειας *Apiaceae*, το γένος *Conium* φέρει πτητικά συστατικά. Από το φυτό έχουν αναφερθεί επιπλέον στεροειδή, φλαβονοειδή, κουμαρίνες και πολυακετυλένια. (Καββαδάς, 1956, Βλάσση, 2016). Ακόμα το εκχύλισμα του *conium* εμφανίζει αναλγητική, αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση. Σύμφωνα με τα ευρήματα μελέτης της ποσοτικοποίησης του ολικού περιεχομένου πολυφαινόλων το υδατικό εκχύλισμα του *Conium divaricatum* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν το πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό εκχύλισμα και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε για περαιτέρω έρευνα. (Λαδάς, 2018)

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εξεταστεί η επίδραση του υδατικού εκχυλίσματος *Conium divaricatum* στη ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά EA.hy926. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό της ενδογενούς γλουταθειόνης και των ελευθέρων ριζών αλλά και φασματοφωτομετρικές μέθοδοι λιπιδικής υπεροξειδωσης, ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και προσδιορισμού της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος για την κυτταρική σειρά EA.hy926 με σκοπό να επιλεγούν 4 μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις για την εκπόνηση της μελέτης. Έτσι, επιλέχθηκαν συγκεντρώσεις μικρότερες από 100 μg/ml. Στην συνέχεια προσδιορίστηκε η γλουταθειόνη και οι ελεύθερες ρίζες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής, συνολικά το εκχύλισμα βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μια αύξηση των επιπέδων της ενδογενούς γλουταθειόνης (GSH) που φτάνει και το 47,26% στη μεγαλύτερη δόση χορήγησης του φυτικού εκχυλίσματος (50 μg/ml), με στατιστικά σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις 12, 25 και 50 μg/ml. Η αύξηση της ενδογενούς γλουταθειόνης μπορεί να οφείλεται σε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης ή της δράσης των ενζύμων που την συνθέτουν όπως η συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCL) και η συνθετάση της γλουταθειόνης καθώς και η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GR) που την

αναγεννά ανάγοντας την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Ακόμη, μια πιθανή εξήγηση είναι η εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών από τα αντιοξειδωτικά του εκχυλίσματος με αποτέλεσμα να γίνεται εξοικονόμηση της γλουταθειόνης.

Ακολούθησαν οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης του εκχυλίσματος. Ο προσδιορισμός της λιπιδικής υπεροξείδωσης είναι μια μέθοδος που ανιχνεύει τα επίπεδα της μηλονικής διαλδεύδης (MDA) όταν αυτή συνδέεται με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα μείωσε τα επίπεδα της οξείδωσης των λιπιδίων με στατιστικά σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις 12, 25 και 50μg/ml. Η μεγαλύτερη μείωση εμφανίζεται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση του εκχυλίσματος και φτάνει το 61,46%. Κατά την λιπιδική υπεροξείδωση στις βιολογικές μεμβράνες προκαλούνται διαταραχές στη ρευστότητά τους, μείωση του μεμβρανικού δυναμικού, αύξηση της διαπερατότητάς τους και, πιθανώς, λύση με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των κυτταρικών συστατικών στον περιβάλλοντα χώρο. Η μείωση της λιπιδικής υπεροξείδωσης των κυττάρων, έπειτα από την επίδραση του εκχυλίσματος, φανερώνει την προστατευτική του δράση.

Οι οξειδωτικές βλάβες των πρωτεϊνών εμπλέκονται στους μοριακούς μηχανισμούς μιας σειράς διαφορετικών ασθενειών, αλλά και στη φυσιολογική εξέλιξη της γήρανσης. Όλες σχεδόν οι κυτταρικές πρωτεΐνες είναι δυνατόν να αποτελέσουν στόχους για τις ελεύθερες ρίζες. Οι επιπτώσεις της οξείδωσης των πρωτεϊνών περιλαμβάνουν την άμεση τροποποίηση των πρωτεϊνών, όμως οι κυτταρικές πρωτεΐνες μπορούν, να τροποποιηθούν και έμμεσα, αντιδρώντας για παράδειγμα με προϊόντα της λιπιδικής υπεροξείδωσης (π.χ. μηλονική διαλδεύδη). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων έδειξε ότι το εκχύλισμα λειτούργησε προστατευτικά αφού μείωσε την οξείδωση των καρβονυλίων με στατιστικά σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις 12, 25 και 50μg/ml. Η μεγαλύτερη μείωση εμφανίζεται στην μεγαλύτερη συγκέντρωση του εκχυλίσματος και φτάνει το 61%.

Στην συνέχεια εξετάστηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου το εκχύλισμα έχει μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα δοσοεξαρτώμενη της συγκέντρωσής του με στατιστικά σημαντική αύξηση σε συγκεντρώσεις που ξεκινούν από 4,5μg/ml και φτάνουν έως τα

50μg/ml όπου και εμφανίζει μη κυτταροτοξική δράση. Η αύξηση της TAC του εκχυλίσματος φανερώνει μια αύξηση της συγκέντρωσης των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών. Αυτό υποστηρίζεται και από την αύξηση της GSH που αναφέρθηκε παραπάνω, δηλαδή η αύξηση της TAC οφείλεται τουλάχιστον εν μέρει στην αύξηση της GSH. Επίσης, η αύξηση της TAC σε συνδυασμό με την αύξηση της GSH είναι πιθανοί μηχανισμοί μέσω των οποίων το εκχύλισμα άσκησε προστατευτική δράση έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσής και της οξειδωσής των πρωτεϊνών.

Ωστόσο παρόλο που το εκχύλισμα προκάλεσε αύξηση της TAC στα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν επηρέασε τις ROS. Συγκεκριμένα, στις (ROS), που επίσης προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής, η επώαση με το φυτικό εκχύλισμα στα κύτταρα δεν παρουσίασε κανένα στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα σε καμιά από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Δεδομένου ότι στην παρούσα μελέτη δεν χρησιμοποιήθηκε κάποιος οξειδωτικός παράγοντας, μετρήθηκαν τα ενδογενή επίπεδα ROS. Τα επίπεδα των ROS δεν εμφανίζουν διαφορά σε σχέση με το control και ένας λόγος είναι ότι απαιτούνται φυσιολογικά ορισμένες ποσότητες ελεύθερων ριζών για την κυτταρική ομοιοστάση και την απαραίτητη μεταγωγή σήματος. Επιπλέον, μία εξήγηση για το ότι δεν παρατηρήθηκε μείωση των ROS, θα μπορούσε να είναι ότι τα αντιοξειδωτικά του συγκεκριμένου εκχυλίσματος μπορούν να προστατεύουν από τις βλαβερές επιδράσεις των ROS στα λιπίδια και τις πρωτεΐνες όπως έδειξαν οι μέθοδοι των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, αλλά δεν μπορούν να αντιδρούν με τις ελεύθερες μορφές των ROS.

Συμπερασματικά, το υδατικό εκχύλισμα του *Conium divaricatum* εκδηλώνει μια προστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού στρες στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσής και της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων δείχνει την προστασία του εκχυλίσματος έναντι του οξειδωτικού στρες. Επίσης, η αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας φανερώνει είτε μια άμεση δράση των αντιοξειδωτικών που περιέχονται στο εκχύλισμα είτε μια αύξηση της συγκέντρωσης μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών. Αυτό υποστηρίζεται και από την αύξηση στα επίπεδα της γλουταθειόνης που φαίνεται ότι αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό για την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής ικανότητας από το *Conium divaricatum* στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα επίπεδα των ROS δεν εμφανίζουν διαφορά σε σχέση με το control πιθανών, επειδή τα αντιοξειδωτικά του εκχυλίσματος προστατεύουν από τις βλαβερές επιδράσεις των ROS τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες

όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των TBARS και των CARBs, αλλά δεν αντιδρούν με τις ελεύθερες μορφές οξυγόνου.

Τέλος, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την αντιοξειδωτική δράση του γένους *Conium divaricatum* μιας και δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές. Για παράδειγμα, ένα πιθανό μονοπάτι μέσω του οποίου μπορεί να ασκεί την αντιοξειδωτική του δράση μπορεί να είναι μέσω του Nrf-2, του κύριου αντιοξειδωτικού μεταγραφικού παράγοντα που ελέγχει την έκφραση πολλών αντιοξειδωτικών. Επίσης, θα ήταν χρήσιμο να απομονωθούν τα επιμέρους στοιχεία του εκχυλίσματος ώστε να γίνουν γνωστά τα βιοδραστικά συστατικά του, στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική του δράση. Οι εφαρμογές της έρευνας όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση αυτού του φυτού θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη και παραγωγή καινοτόμων προϊόντων, όπως βιολειτουργικών τροφίμων και ποτών, είτε άλλου τύπου προϊόντων, όπως φαρμακευτικά ή καλλυντικά προϊόντα ή συμπληρώματα διατροφής.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adlercreutz, H. (2007). Lignans and human health. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 44(5-6), 483–525.
- Ames BN (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res* 206: 3-32.
- Arihan O, Boz M, Iskit B A, Ilhan M (2009) Antinociceptive activity of coniine in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 125(2):274-278.
- Baranano, D.E., Rao, M., Ferris, C.D., Snyder S.H. (2002). Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 16093–16098.
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010) Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(4), 228–237.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14–21.
- Bigard, A.X. (2001). Lesions musculaires induites par l' exercice et surentrainement. *Sci. Sports*. 16, 204-215.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
- Cooper, C.E., Vollaard, N.B.J., Choueiri, T., Wilson, M.T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 2280-2285.
- Crane, F.L. (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.* 20, 591-598.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321–1342.
- Davies, K.J., Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S.F., Hochstein, P. (1986). Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem. J.* 235, 747-754.
- Davis KJ (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* 262:9895-9901.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H (2002). Free radical induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 32: 1102-1115.

- Downey, J.M. (1990). Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia-reperfusion. *Annu. Rev. Physiol.* 52, 487-504.
- Elsayed NM, Omaye ST, Klain GJ, Korte DW Jr (1992). Free radical mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology* 72:153-165.
- Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G.(2002)Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 18, 872–879.
- Girotti A.W. (1985). Mechanisms of lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med*, 1(2), 87-95.
- Golden, T.R., Hinerfeld, D.A., Melov, S. (2002). Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell.* 1, 117-123.
- Grootveld, M., Halliwell, B. (1987). Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids. A potential index of free-radical reactions in vivo? *Biochem. J.* 243, 803-808
- Grune T, Reinhecker T, Davies KJA (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEBJ* 11:526-534.
- Guo Z. M., Van Remmen H., Yang H., Chen X. L., Mele J., Vijg J., Epstein C. J., Ho Y. -S., Richardson A.(2001) Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxLDL induced apoptosis in mouse aorta cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1131– 1138.
- Halliwell, B. (2001). Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of life sciences* 1-7.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1999). Free radicals in biology and medicine (3rd ed.). Oxford Science Publications (Chapter 2).
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.
- Halliwell, B., Gutteridge, M.C. (1998). Free radicals in biology and medicine. Oxford Science Publications Third Edition.
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance, 2, 950–988.
- Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol* 300:156-166.
- Hellsten, Y., Sjodin, B., Richter, E.A., Bangsbo, J. (1998). Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *Am. J. Physiol.* 274, E600-606.

- Hellsten, Y., Tullson, P.C., Richster, E.A., Bangsbo, J. (1997). Oxidation of urate in human skeletal muscle during exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 169-174.
- Ider Y, Vincent F, Duranton B, Badolo L, Gosse F, Bergmann C, Seiler N, Raoul F.(2000). Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes, and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett*, 158:85-91.
- Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* 28: 625-635.
- Kanner J and Lapidot T (2001). The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic Biol Med* 31: 1388-1395.
- Kampa M, Hatzoglou A, Notas G, Damianaki A, Bakogeorgou E, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin PM, Castanas E.(2000). Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer*, 37: 223-33
- Krinsky, N. I. (2002). Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 540S–542S.
- Kuppasamy, P., Zweier, J.L. (1989). Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J. Biol. Chem.* 264, 9880-9884.
- Levine, R.L., Moskowitz, J., Stadtman, E.R. (2000). Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *Intl. Union Biochem. Mole. Biol. Life.* 50, 301–307.
- Lijinsky W (1999). N-Nitroso compounds in the diet. *Mutat Res* 443: 129-138.
- Linnane, A.W., Zhang, C., Yarovaya, N., Kopsidas, G., Kovalenko, S., Papakostopoulos, P., Eastwood, H., Graves, S., Richardson, M. (2002). Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959, 396-411.
- Livrea, M.A., Tesoriere, L., Bongiorno, A., Pintaudi, A.M., Ciaccio, M., Riccio, A. (1995). Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 401-409.
- Madaan R and Kumar S (2012) Screening of alkaloidal fraction of *Conium maculatum* L. aerial parts for analgesic and antiinflammatory activity. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 74(5):457–460.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004a). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727–747.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004b). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727–747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Remesy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), 230S–42S.
- Maulik, N., Yoshida, T., Engelman, R.M., Bagchi, D., Otani, H., Das, D.K. (2000). Dietary coenzyme Q(10) supplement renders swine hearts resistant to ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H 1084-1090.
- Mennen, L., Walker, R., Bennetau-Pelissero, C., & Scalbert, A. (2005). Risks and safety of polyphenol consumption. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), 326S–329S.
- Mondal J, Panigrahi K A, Khuda-Bukhs R A (2014) Anticancer potential of *Conium maculatum* extract against cancer cells in vitro: Drug-DNA interaction and its ability to induce apoptosis through ROS generation. *Pharmacococnosy magazine* 10(39):524-533.
- Mozaffarian D., Rimm E. B., King I. B., Lawler R. L., McDonald G. B., Levy, W. C. (2004) Trans fatty acids and systemic inflammation in heart failure. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:1521–1525.
- Mylonas C, Kouretas D (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13: 295-309.
- Naito Y, Yoshikawa T, Yoshiba N, Kondo M (1998). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in idomethanic-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 43:30S-34S.
- Obata T, Yamanaka Y, Kinemuchi H, Orelan L (2001). Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Res* 906:170-175.
- Ozcelik B, Kusmenoglu S, Turkoz S, Abbasoglu U (2004) Antimicrobial Activities of Plants from the Apicaceae. *Pharmaceutical Biology* 42(7):526–528.
- Ozhogina, O.A., Kasaikina, O.T. (1995). β -carotene as an interceptor of free radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 575-581.

- Palmer, F.M., Nieman, D.C., Henson, D.A., McAnulty, L., Swick, N.S., Utter, A.C., Vinci, D.M., Morrow, J.D. (2003). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary Ig A changes following an ultramarathon. *Eur. J. Appl. Physiol.* 89, 100-107.
- Powers, S.K., Lennon, S.L. (2000). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc. Nutr. Soc.* 58, 1025-1033.
- Prior, R.L., Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 27,1173-1181
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(3), 586–621.
- Ray RS, Mehrotra S, Shanker U, Babu GS, Joshi PC, Hanss RK (2001). Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug Chem Toxicol* 24: 191-200.
- Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Rezaee M B, Jaimand K, Alinezhad S, Saberi R, Yoshinari T (2009) Chemical composition and antiaflatoxigenic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control* 20:1018–1024
- Rodrigo, R., Libuy, M., Feliu, F., & Hasson, D. (2014). Polyphenols in disease: from diet to supplements. *Current pharmaceutical biotechnology*, 15(4), 304–317.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287–306.
- Scholz RW. Graham KS. Gumpricht E. Reddy CC. Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation. *Ann NY Acad Sci* 1989;570:514-7.
- Sen, C.K. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med. Sci. Sports Exerc.* 33, 368-370.
- Sevanian, A., Davies, K.J., Hochstein, P. (1991). Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 54, 1129S-1134S.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry*, 30(2), 91–113.

- Stadtman ER (1986). Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems, implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem Sci* 11: 11-12.
- Stocker, R. (2004). Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 841–849.
- Sumpio, B.E, Riley, J.T, Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1508-1512.
- Svensson, M.B., Ekblom, B., Cotgreave, I.A., Norman, B., Sjoberg, B., Ekblom, O., Sjodin, B., Sjodin, A. (2002). Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta Physiol. Scand.* 176, 43-56.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246.
- Witt, E.H., Reznick, A.Z., Viquie, C.A., Starke-Reed, P., Packer, L. (1992). Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J. Nutr.* 122, 766-773.
- Witztum J.L. and Steinberg D. (2001). The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc. Med.* 11:93– 102.
- Yu, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74, 139–162.
- Zaloga G. P., Harvey K. A., Stillwell W., Siddiqui, R. (2006) Trans fatty acids and coronary heart disease. *Nutr. Clin. Prac.* 21:505–512.
- Αποστολίδου Χ. (2016). Επίδραση των αντιοξειδωτικών ουσιών του ερυθρού οίνου και της ρεσβερατρόλης στην πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων σε υγιείς και ασυμπτωματικούς υπερλιπιδαιμικούς συμμετέχοντες. Διδακτορική Διατριβή. Τμήμα Χημικών Μηχανικών. Α.Π.Θ.
- Βλάση Α., (2016). «Μελέτη πτητικών συστατικών του γένους *Conium* L. (*Conium divaricatum* Boiss & Orph., *C. maculatum* L.), Έλεγχος τοξικότητας.» Τμήμα Φαρμακευτικής. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Καββαδάς Δ Εικονογραφημένον Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν Τόμος Ε. Πελεκάνος, Αθήνα 1956, σελ 2228-2229.
- Κολιάκου Η. (2018). «Διαφοροποίηση μονοκυττάρων προς ενδοθηλιακά κύτταρα. Καλλιέργεια σε σταθερά υποστρώματα». Τμήμα Βιολογίας. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Λαδάς Δ., (2018). «Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης σε εκχυλίσματα από *Conium divaricatum*, *Ruta graveolens*, και *Artemisia*

arborescens.» Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας.